

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Robson Santos, pela paciência, pela compreensão, pelos ensinamentos, pelas lições diárias de como superar as dificuldades de se fazer pesquisa em um país com tão poucos investimentos nessa área. Obrigada pelos puxões de orelha nos momentos necessários e pelos elogios nas horas certas. Obrigada pela grande contribuição tanto na minha formação acadêmica quanto na minha vida pessoal. Você, não é apenas um orientador, mas também um amigo, o qual serei eternamente grata.

Ao Professor Rubén, pela grande colaboração no desenvolvimento desse trabalho, pelas considerações e sugestões feitas, pelas explicações e pela simpatia.

Ao Washington por ter dedicado um pouquinho do seu tempo comigo para tentar enfiar um pouco de química na minha cabeça. Pela paciência constante, pelas microesferas, pastilhas e pelos experimentos de liberação etc.

Aos meus pais, por tudo que são para mim, por tudo que me ensinaram, pelos valores, pelo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo. Ao meu pai, homem da ciência, dos números, das físicas e das matemáticas. Meu pai que nunca me deu uma resposta pronta na vida, mas que me mostrava o caminho para consegui-la. Grande incentivador, você, mesmo de longe, estará sempre comigo. Obrigada meu pai! À minha mãe, mulher guerreira, batalhadora, sábia, forte. Pessoa que nunca deixou de acreditar em mim. Minha maior amiga e melhor professora. Se hoje estou aqui, com mais esta conquista, você é a grande responsável. Obrigada minha mãe!

Aos meus irmãos Fábio e Mírian, também sempre ao meu lado mostrando que a união é capaz de superar todos os obstáculos. Agradeço muito a vocês!

Ao meu avô Manoel *in memoriam*, que sempre deu seu sangue para que seus filhos e netos tivessem as “letras” que ele não tinha tido a oportunidade de ter.

À minha avó Luíza, pelas lições de vida, pela simplicidade e amor que sempre teve com os seus.

À minha avó Sílvia e avô João, pelos momentos gastronômicos, alegres e de descontração. Pela fé que sempre tiveram em conquistar um amanhã cada vez melhor. Pelo grande exemplo de união e companheirismo.

Aos meus tios, tias, primos e primas, pela torcida, sempre.

À minha querida avó Ruth, que me acolheu como sua neta, como sua amiga e confidente. Agradeço o amor, o carinho, as preocupações e principalmente por todas as orações feitas para que eu esteja sempre bem e com saúde. Continue rezando por mim.

À tia Ninha, pela revisão ortográfica de partes do manuscrito.

Ao Tio Ivan pelo incentivo e carinho e que mesmo de longe nunca deixou de torcer por mim. Obrigada!

Ao meu marido Fred, por torcer tanto por mim, por rir e chorar comigo e por não desistir de acreditar em mim. Por estar sempre ao meu lado, fazendo a minha vida mais alegre e feliz! Agradeço a você por ter feito de mim uma pessoa melhor, mais paciente e tolerante. Você é meu porto seguro, a mão que me levanta, minha vida! Eu te amo muito, não se esqueça.

Aos meus queridos sogros Beth e Oliveiros, que me tem como filha e assim dispensam comigo amor, carinho e muitos mimos. Agradeço pela acolhida, pelo carinho com que me receberam em sua casa e por me tornarem parte da família. Obrigada pelos conselhos, pela força, por não me deixarem desistir. Muito obrigada!

Ao meu cunhado internacional, pianista de mão cheia, Rodrigo Queiroz! Agradeço a você pelos momentos de risadas com suas histórias de um brasileiro perdido em Nova York, por nos brindar, sempre que possível, com suas mãos encantadas que fazem mágicas no piano tocando músicas capazes de nos fazer crer que só há beleza no mundo.

Ao nosso amigo Zé Antônio, por seu jeito simples de ser, sempre uma companhia muito agradável. Obrigada pela amizade.

Às melhores amigas do mundo, Chemim, Lu, Nalú e Tchuca! Vocês tornaram a minha vida muito mais divertida e me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra amizade. Obrigada pelas horas de estudo, os momentos de diversão que não foram poucos, os de estudo e diversão, as lágrimas, os sorrisos, as brigas de vez em quando, afinal somos todas bem diferentes, mas iguais em uma coisa, levamos dentro do coração a amizade que temos. Adoro vocês!

À minha grande amiga de infância, Carolina. Nunca entendi como duas meninas conseguiram construir uma grande amizade morando tão longe uma da outra, mas isso não importa. O que importa realmente é que nunca me esqueço de você. Você está sempre presente aqui comigo. Obrigada por tudo, por tudo mesmo!

Aos meus amigos do laboratório: Aline, Ana Quênia, Giancarla, Marisa, Glória Denise, Daniele, Gisele, Andrey, Gui, Daniel, Gonzaga, Rodrigo, Carlos Henrique,

Mariana, Tatiane, Ana Paula Nadu, Cynthia, Renata, Sordaine, Bethinha, Edson e tantos outros...

Ao meu grande amigo Zezé, por tudo que me ensinou e pelo tanto que me ajudou.

Aos meus colegas por cederem os BIOPACs nas horas mais necessárias.

Aos animais cujas vidas foram tiradas em prol da ciência. Vocês têm todo o meu respeito.

À Vanessa do biotério, pela paciência com meus animais em tratamento crônico.

A todos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, em especial às Professoras Adelina e Maria José e também à Celinha por resolver todos os nossos pepinos.

Um agradecimento especial à Rose, por ser essa criatura linda e por estar sempre com um sorriso otimista no rosto.

E a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Sistema renina-angiotensina.....	1
1.2. Bloqueio das ações do Sistema Renina Angiotensina.....	8
1.2.1. Inibidores de ECA.....	9
1.2.2. Antagonistas de receptor AT <sub>1</sub> .....	9
1.3. Formulações farmacêuticas baseadas em ciclodextrinas e polímeros biodegradáveis.....	11
1.3.1. Ciclodextrinas.....	11
1.4. Sistemas de liberação controlada.....	12
1.4.1. Polímeros biodegradáveis.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivo específico.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Animais.....	21
3.2 Procedimentos experimentais.....	21
3.2.1 Procedimentos cirúrgicos.....	21
3.2.1.1 Cirurgia para implante de cânulas na veia e artéria femoral.....	21
3.2.1.2 Medida da pressão de cauda por pletismografia.....	22
3.2.1.3 Registro dos parâmetros cardiovasculares: PAP, PAM e FC.....	23
3.2.1.4 Preparo das microesferas de PLGA.....	23
3.2.1.5 Cirurgia para implante subcutâneo do dispositivo de polímero biodegradável/Losartan em forma de pastilha Administração de Losartan por via subcutânea.....	23
3.2.1.6 Administração de Losartan por via subcutânea.....	24
3.3 Protocolos experimentais.....	24

3.3.1 PROTOCOLO 1 - Teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar submetidos à injeção subcutânea de Losartan.....	24
3.3.2 PROTOCOLO 2 - Teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar , 2, 6, 12, 24, 36, e 48 horas após a administração de uma suspensão de microesferas de PLGA/Losartan ou Losartan/ $\beta$ -CD/PLGA - Efeito agudo.....	25
3.3.3 PROTOCOLO 3 - Teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar oito dias após o tratamento com PLGA/Losartan sob a forma de pastilha ou suspensão de microesferas – Efeito crônico.....	27
3.3.4 PROTOCOLO 4 - Teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 8 ou 21 dias após implantação de dispositivo de liberação controlada de CI/PLGA sob a forma pastilha.....	29
3.3.5 PROTOCOLO 5 – Liberação do Losartan a partir de microesferas de PLGA/Losartan e CI/PLGA <i>in vitro</i> .....	31
3.4 Análise estatística.....	33
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após a administração aguda de Losartan.....	34
4.2. Alterações agudas da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após a administração das suspensões de microesferas de PLGA/Losartan ou CI/PLGA administradas por via subcutânea.....	36
4.2.1. Suspensão de microesferas de PLGA/Losartan em salina.....	36
4.2.2. Suspensão da formulação CI/PLGA.....	49
4.3. Alterações crônicas da pressão sistólica de animais normotensos durante o tratamento com as pastilhas de PLGA/Losartan ou CI/PLGA administradas por via subcutânea.....	66

4.3.2. CI/PLGA.....	67
4.4. Alterações crônicas da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após a administração das formulações PLGA/Losartan ou CI/PLGA administradas por via subcutânea.....	69
4.4.1. Suspensões de microesferas compostas por PLGA/Losartan.....	69
4.4.2. Dispositivo em forma de pastilha composto por PLGA/Losartan.....	70
4.4.3. Dispositivo em forma de pastilha composto por CI/PLGA.....	71
4.5. Liberação do Losartan <i>in vitro</i> a partir de microesferas de PLGA/Losartan e CI/PLGA.....	72
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>

**LISTA DE TABELAS****Página**

<b>TABELA 1 -</b>	Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos PLGA ( $n = 7$ ), Losartan ( $n = 6$ ) e PLGA/Losartan ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média.....	62
<b>TABELA 2 -</b>	Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos PLGA ( $n = 6$ ), Losartan ( $n = 5$ ) e PLGA/Losartan ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. .....	62
<b>TABELA 3 -</b>	Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos $\beta$ -CD/PLGA ( $n = 4$ ), Losartan ( $n = 6$ ) e CI/PLGA ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. .....	63

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>FIGURA 1:</b> Via clássica de formação de Angiotensina II (Weber KT, 2001).....	1
<b>FIGURA 2:</b> Representação esquemática das vias enzimáticas envolvidas na geração de peptídeos angiotensinérgicos (FERREIRA & SANTOS, 2005).....	5
<b>FIGURA 3:</b> Estrutura do Losartan potássico.....	10
<b>FIGURA 4:</b> Níveis da droga no plasma (A) dosagem tradicional e (B) liberação controlada.....	13
<b>FIGURA 5:</b> Estrutura química do PGA (A), PLA (B) e PLGA (C).....	17
<b>FIGURA 6:</b> Figura ilustrativa de uma medida da pressão sistólica obtida através do método da pletismografia de cauda digital.....	21
<b>FIGURA 7:</b> Bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido duas horas após a administração por via subcutânea do Losartan na dose de 0,7 mg/kg em ratos Wistar. <b>Painel A</b> representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); <b>Painel B</b> representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca (FC). —■—Curva controle realizada após administração por via subcutânea de uma solução de salina fisiológica, $n = 5$ ; —□—Curva realizada duas horas após a administração do Losartan por via subcutânea, $n = 5$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ comparado à curva controle salina.	29
<b>FIGURA 8:</b> Bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido duas horas após a administração por via subcutânea do Losartan de 3,0mg/kg em ratos Wistar. <b>Painel A</b> representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); <b>Painel B</b> representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca (FC). —■—Curva controle realizada após administração por via subcutânea de uma solução de salina fisiológica, $n = 5$ ; —□—Curva realizada duas horas após a administração do Losartan por via subcutânea, $n = 5$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,01$ comparado à curva controle.....	30
<b>FIGURA 9:</b> Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após injeção de salina por via subcutânea. —□—Grupo controle PLGA, $n = 5$ ; —■—Grupo controle Losartan, $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan, $n = 7$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM.....	31
<b>FIGURA 10:</b> Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 2, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA, $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan, $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan, $n = 7$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. .* $p < 0,05$ comparado ao grupo Losartan, *** $p < 0,001$ comparado à curva PLGA.....	32
<b>FIGURA 11:</b> Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 6, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA, $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan, $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan, $n = 7$ . Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ comparado à curva PLGA.....	33



- FIGURA 12:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 12, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva Losartan, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 34
- FIGURA 13:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 24, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva Losartan, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 34
- FIGURA 14:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 36, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado à curva PLGA, \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva PLGA, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 35
- FIGURA 15:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 48, horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado à curva PLGA, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 35
- FIGURA 16:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II ratos Wistar, 2 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 36
- FIGURA 17:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 6 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 37
- FIGURA 18:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 12 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 38

- FIGURA 19:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 24 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 39
- FIGURA 20:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 36 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 39
- FIGURA 21:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 48 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado à dose 10ng/0.1ml, \*\*  $p < 0,01$  comparado a dose 20ng/0.1ml, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à dose 40ng/0.1ml..... 40
- FIGURA 22:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos wistar após injeção de salina por via subcutânea. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 41
- FIGURA 23:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 2 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 41
- FIGURA 24:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 6 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PLGA, \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo PLGA, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo PLGA..... 42
- FIGURA 25:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 12 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo PLGA..... 42

- FIGURA 26:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 24 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PLGA, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo PLGA..... 43
- FIGURA 27:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 36 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 43
- FIGURA 28:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 48 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PLGA, \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo PLGA..... 44
- FIGURA 29:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após injeção de salina por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 45
- FIGURA 30:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 2 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 46
- FIGURA 31:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 6 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 46
- FIGURA 32:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 12 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 47

- FIGURA 33:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 24 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 47
- FIGURA 34:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 36 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 48
- FIGURA 35:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 48 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado à curva  $\beta$ -CD, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado às curvas PLGA e  $\beta$ -CD..... 48
- FIGURA 36:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II ratos Wistar, 2 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 49
- FIGURA 37:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 6 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 50
- FIGURA 38:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 12 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 51
- FIGURA 39:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 24 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 52
- FIGURA 40:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 36 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à salina..... 52

- FIGURA 41:** Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar, 48 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à salina, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à salina..... 53
- FIGURA 42:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após injeção de salina por via subcutânea. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 54
- FIGURA 43:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 2 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 55
- FIGURA 44:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 6 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 55
- FIGURA 45:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 12 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA..... 56
- FIGURA 46:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 24 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva PLGA..... 56
- FIGURA 47:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 36 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 57
- FIGURA 48:** Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 48 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○.....Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 57

- FIGURA 49:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após injeção de salina por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 58
- FIGURA 50:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 2 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 58
- FIGURA 51:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 6 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 59
- FIGURA 52:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 12 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 59
- FIGURA 53:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 24 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 60
- FIGURA 54:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 36 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 60
- FIGURA 55:** Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 48 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 61
- FIGURA 56:** Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 8 dias de tratamento com a formulação PLGA/Losartan sob a forma de suspensão. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca. —■—Grupo controle PLGA,  $n = 4$ ; —●—Grupo controle Losartan,  $n = 4$ ; —□—Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 6$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 64

- FIGURA 57:** Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada composto pelo polímero PLGA associado ou não ao Losartan na dose de 0,7 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca (FC). —■—Grupo controle PLGA,  $n = 7$ ; -●- - Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; —□—Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 8$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 65
- FIGURA 58:** Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada composto pelo polímero PLGA associado ou não ao Losartan na dose de 3,0 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca (FC). —■—Grupo controle PLGA,  $n = 7$ ; -●- - Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; —□—Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 8$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 66
- FIGURA 59:** Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar. Os Painéis A e B representam os resultados obtidos após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada de CI/PLGA/ $\beta$ -CD/PLGA na forma de pastilha. Nesses experimentos a dose de Losartan usada foi de 0,7 mg/kg. Os Painéis C e D representam os resultados obtidos após 21 dias de tratamento com a mesma formulação, porém, a dose de Losartan usada foi de 3.0 mg/kg. **Painéis A e C** representam os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painéis B e D** representam os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca. Nos painéis A e B: Grupo controle  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ ; Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 6$ . Nos painéis C e D: Grupo controle  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 5$ ; Grupo controle Losartan,  $n = 6$ ; Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 5$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 67
- FIGURA 60:** Curvas de liberação *in vitro* de Losartan encapsulado em PLGA ou incluído em  $\beta$ -CD encapsulado em PLGA,  $n = 3$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM..... 68

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha$	Alpha
APA	Aminopectidase A
APN	Aminopectidase N
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III (Ang 2-8)	Angiotensina III
Ang IV (Ang 3-8)	Angiotensina IV
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang-(1-9)	Angiotensina 1-9
AT <sub>1</sub>	Receptor da Angiotensina II do subtipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor da Angiotensina II do subtipo 2
$\beta$	Beta
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
Bk	Bradicinina
CD	Ciclodextrina
CI	Composto de inclusão
°C	Grau Célsius
des-arg Bk	Des-arg bradicinina
ECA	Enzima conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de Angiotensina 2
EPM	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina 1
FC	Frequência cardíaca
$\gamma$	Gama
g	Grama
$\beta$ 1	Receptor $\beta$ 1 adrenérgico
kg	Quilograma
L	Litro
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrometro
Mas	Receptor da Angiotensina 1-7
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
ng	Nanograma
NEP	Neutral endopeptidase
nmol	nanomol
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEP	Prolilendopeptidase
PLA	Poli-lactide acid
PLG	Poli glicolide acid
PLGA	Poly-lactide- glycolide acid
PS	Pressão sistólica
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SHR	Spountaneously Hypertensive Rat
SRA	Sistema renina-angiotensina
Tg	Temperatura de transição vítrea



## RESUMO

Nesse estudo avaliamos a viabilidade da utilização de polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada para o Losartan. Dois tipos de formulações na base PLGA (poli ácido láctico glicólico) para o Losartan foram testados. Foram utilizados ratos Wistar não anestesiados instrumentados para registro da pressão arterial e administração intravenosa de peptídeos. A capacidade de bloqueio do efeito pressor da Ang II foi testada 2, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a administração subcutânea das formulações PLGA/Losartan e CI/PLGA (composto de inclusão formado pelo Losartan incluído na ciclodextrina e encapsulado pelo polímero). Um bloqueio acentuado do efeito pressor da Ang II foi obtido tanto nos animais tratados com PLGA/Losartan quanto nos tratados com CI/PLGA comparados aos seus respectivos controles durante 48 horas. Nos animais tratados apenas com Losartan observamos um bloqueio significativo do efeito pressor por 24 horas, quando comparado com o controle PLGA e por 36 horas, quando comparado com os controles PLGA e  $\beta$ -CD. Após esses períodos as respostas pressoras no grupo Losartan começaram a retornar às condições controle enquanto as respostas obtidas nos grupos PLGA/Losartan e CI/Losartan continuaram acentuadamente reduzidas. Os dados da frequência cardíaca obtidos para cada grupo experimental estão de acordo com o que foi observado para a pressão arterial média durante as 48 horas de tratamento ao qual foram submetidos. Os resultados encontrados nos experimentos agudos indicam que o encapsulamento do Losartan pelo PLGA e sua inclusão em  $\beta$ -CD praticamente dobrou a duração do tempo de ação desse fármaco, que passou de 24 para 48 horas. Em experimentos crônicos testamos o bloqueio do efeito pressor da Ang II ao final de 8 e 21 dias de tratamento, utilizando formulações sob a forma de suspensão e pastilha. Contudo, tais experimentos não forneceram resultados significativos quanto ao bloqueio do efeito pressor da Ang II. Em experimentos de liberação *in vitro* com nossas preparações, o “burst effect”, ou seja, a liberação de 100% do fármaco em 1 hora de experimento observado indicou que a totalidade do Losartan foi liberada no tempo aproximado de 1 hora provocando o incremento de apenas 1 hora na sua liberação. Isso resultou em um aumento de cerca de 24 horas na duração do efeito antagonista. Assim, o sistema de liberação controlada de Losartan na base PLGA representa um ganho de 24 horas na duração da ação do efeito antagonista do fármaco e de seu metabólito, não se aplicando, no entanto, para bloqueio crônico. Esses dados sugerem que pequenas alterações na taxa de conversão de Losartan em seu metabólito ativo EXP3174 podem resultar em importantes mudanças no nível e na duração do bloqueio de Ang II. Nossos dados sugerem que a utilização de polímeros com menor taxa de “burst effect” para o Losartan podem propiciar o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada do Losartan de longa duração.

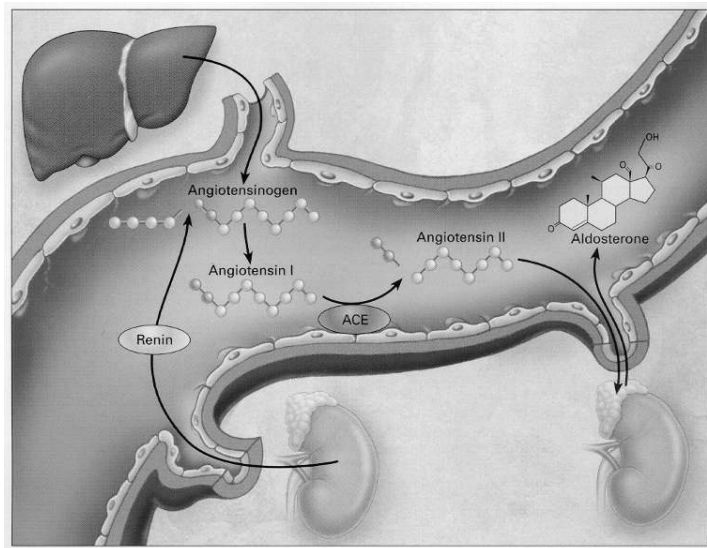
## ABSTRACT

In this work, we evaluate the viability of using biodegradable polymers for the development of controlled release systems for Losartan. Two kinds of formulations in PLGA (Poly-lactide- glycolide acid) base for Losartan were tested in anesthetized Wistar rats instrumented to arterial pressure register and intravenous administration of peptides. Of those doses tested during the initial acute experiments, the 3,0 mg/kg Losartan dose presented better efficiency in blocking the pressure response caused by 20 ng of Ang II. After that, we tested the capacity of Ang II pressure effect blocking by the formulations PLGA/Losartan and CI/PLGA, 2, 6, 12, 24, 36 and 48 hours after its subcutaneous administration. An accentuated Ang II pressure effect blockade was obtained in both the animals treated with PLGA/Losartan and CI/PLGA, when compared to its respective controls during the 48 treatment hours. However, in the animals treated with Losartan only, we observed a significant 24 hours Ang II pressure effect blockade, when compared with the PLGA control and a 36 hours Ang II pressure effect blockade when compared with the PLGA and  $\beta$ -CD controls. After these periods, the pressure responses in the Losartan group begin to return to control conditions, as the responses obtained in the groups PLGA/Losartan and CI/Losartan remained acutely reduced. When comparing the Losartan and the PLGA/Losartan treated animals, we noticed that there were no significant differences between them during the 48 hours of treatment. The same was observed when comparing the Losartan and the CI/PLGA groups. The cardiac frequency data obtained for each experimental group are in agreement with what was observed for the mean arterial pressure during the 48 hours of treatment. The findings of the acute experiments indicate that the Losartan encapsulation in PLGA and its inclusion in  $\beta$ -CD, nearly doubled the duration of its action time, from 24 hours to 48 hours. In chronic experiments we tested the Ang II pressure effect blockade at the end of 8 and 21 days of treatment with both suspension and controlled release device pellets formulations. However, these experiments do not provide significant results concerning the Ang II pressure effect blockade. In *in vitro* experiments performed with our preparations, the observed burst effect (release of 100% of drug in one hour of experiment) indicates that the totality of the Losartan was released in the approximated time of 1 hour, provoking the increase of just 1 hour in its liberation. This resulted in an increment of 24 hours in the antagonist effect duration. We found that the PLGA based Losartan controlled release system represents a gain of 24 hours in the duration of the antagonist effect of the drug and its metabolite, however, not to apply to chronic blockade. This occurs because even little alterations in the Losartan conversion ratio in EXP3174 can result in important changes in the level and duration of the Ang II blockade. Our data suggest that the use of polymers with lower “burst effect” for Losartan may allow the development of controlled release device of Losartan of long duration.

## 1.0 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina angiotensina (SRA) tem um papel importante na regulação da pressão arterial, dos eletrólitos e da homeostasia dos fluidos (KRIEGER & SANTOS, 1998; SANTOS *et al.*, 2003). Este sistema, com seus componentes renina e angiotensinogênio secretados na circulação pelos rins e fígado, respectivamente, é reconhecido classicamente como um sistema circulante hormonal. Essas duas proteínas são liberadas na corrente sanguínea onde o angiotensinogênio é hidrolisado pela renina formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) que, especialmente, nos vasos pulmonares, é convertido no octapeptídeo angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). Esse peptídeo produzido e transportado na corrente sanguínea age sobre órgãos alvo, tais como, vasos sanguíneos, córtex adrenal, rins e cérebro (KRIEGER & SANTOS, 1998).



**FIGURA 1** - Via clássica de formação de Angiotensina II (WEBER KT, 2001).

Essa visão clássica do SRA, agindo somente como um sistema endócrino foi alterada após a identificação do RNAm para angiotensinogênio e renina, no sistema

nervoso, glândula hipófise, glândula salivar, coração, vasos sanguíneos e órgãos sexuais (DZAU, 1988; FERRARIO *et al.*, 1990; MILSTED *et al.*, 1990). Estes trabalhos demonstraram que os componentes do SRA não se limitam aos rins e fígado locais clássicos de sua expressão gênica (Figura 1), mas, ampliam sua abrangência para uma atuação tecidual funcionalmente distinta, evidenciando a capacidade destes tecidos de produzir, ou até mesmo, de secretar peptídeos angiotensinérgicos. Portanto, as ações locais do SRA poderiam ocorrer na célula que produz o peptídeo (funções intrácina e autócrina), sobre células adjacentes (função parácrina), ou em locais distantes da região de produção (função endócrina) (SANTOS & CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

Pesquisas recentes têm demonstrado que o octapeptídeo Ang II não é o único produto biologicamente ativo do SRA (FERRARIO *et al.*, 1990; SANTOS & CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; SANTOS *et al.*, 2000). Suas ações periféricas e centrais podem ser mediadas por seqüências menores de múltiplos peptídeos angiotensinérgicos, tais como Ang III [(Ang 2-8)], Ang IV [(Ang 3-8)] e Ang (1-7) produzidos por vias proteolíticas distintas interagindo com vários receptores e mediando uma variedade de ações biológicas (SANTOS & CAMPAGNOLE-SANTOS, 1994; SANTOS *et al.*, 2003a).

Uma das principais enzimas desse sistema, a renina, descoberta há 100 anos por Tiegersted e Bergman, pertence à família das aspartilproteases e é secretada pelas células justaglomerulares no rim. Esta secreção é o principal passo regulatório na cascata do SRA circulante, e pode ser estimulada por pelo menos dois mecanismos intra-renais que são ativados ou por uma diminuição na pressão de perfusão renal, ou pela diminuição da carga filtrada de sódio. Mudanças no tráfico simpático nervoso renal estimuladas via atividade  $\beta$ 1 adrenérgica podem também regular a liberação de renina (THURMAN & SCHRIER, 2003).

Uma outra enzima crítica mediadora de numerosos efeitos sistêmicos e locais no sistema cardiovascular presente na cascata de formação da Ang II é a ECA (COATES, 2003). Esta é uma enzima da família das zinco-metaloproteases que catalisa a etapa enzimática final para a formação de angiotensina II em vários tecidos e tipos celulares. O endotélio dos tecidos somáticos é o local clássico de sua produção onde é sintetizada como uma proteína transmembrana contendo dois domínios ativos, capazes de serem inibidos pelos inibidores da ECA (COATES, 2003). Dentro do SRA, a ECA atua como uma dipeptidil carboxipeptidase capaz de clivar dois resíduos da Ang I para formar a Ang II (COATES, 2003). Tal enzima, primariamente ligada ao endotélio, está presente em vários locais incluindo pulmão, rim, coração e cérebro (THURMAN & SCHRIER, 2003), com altas concentrações especialmente no pulmão (BADER *et al.*, 2001).

Recentemente, a descoberta da enzima conversora de Angiotensina 2 (ECA2) forneceu bases bioquímicas para a demonstração da relevância biológica de outro peptídeo angiotensinérgico, além da Ang II, a Ang (1-7) (CRACKOWER *et al.*, 2002). A ECA2 é expressa em vários tecidos, incluindo as células endoteliais vasculares do rim e coração. Ao contrário da ECA, a ECA2 funciona como uma carboxipeptidase, clivando um único resíduo da Ang I para gerar Ang (1-9), e também um único resíduo da Ang II para gerar Ang (1-7) (CRACKOWER *et al.*, 2002). Esta mesma enzima também hidrolisa a des-Arg-BK, mas não hidrolisa a BK. ECA e ECA 2 parecem ter funções complementares para manter o equilíbrio do SRA (VICKERS, 2002). A expressão órgão e célula específica da ECA2, e a clivagem em um único resíduo dos peptídeos vasoativos de maior importância, sugerem um papel essencial para a ECA2 no SRA local em órgãos como o coração e o rim (DONOGUE *et al.*, 2000).

Além da enzima conversora de angiotensina (ECA), várias enzimas podem formar angiotensina II, tanto a partir da angiotensina I como do angiotensinogênio. No

entanto, a real importância dessas vias alternativas para a formação do principal mediador desse sistema, ainda não foi estabelecida (SANTOS & SAMPAIO, 2002). Dentre essas várias enzimas capazes de catalisar a formação de Ang II a partir da Ang I, incluem-se a quimase e a enzima quimiostatina-sensível geradora de Ang II (WEIR & DZAU, 1999; SANTOS & SAMPAIO, 2002). A Ang II por sua vez, também pode ser formada diretamente do angiotensinogênio pela ação da tonina e catepsina (FERRARIO *et al.*, 1990).

A biotransformação de Angiotensina I e Angiotensina II em outras angiotensinas depende das várias outras vias enzimáticas, das quais merecem destaque: a endopeptidase neutra, a prolil-endopeptidase, a prolil- carboxipeptidase além da ECA2 (TIPNIS *et al.*, 2000), ilustradas na Figura 2.

A endopeptidase neutra (NEP), é uma metaloprotease, ligada à membrana, cuja atividade é a hidrólise de diversos peptídeos endógenos na porção amino dos resíduos hidrofóbicos. Esta ectoenzima está localizada abundantemente no rim, principalmente nas vesículas em borda de escova dos túbulos proximais e é capaz de catalisar a formação da angiotensina-(1-7) a partir da angiotensina I bem como inativar a Ang II hidrolisando a ligação Tir-Val desse peptídeo (SANTOS & SAMPAIO, 2002).

A prolilendopeptidase (PEP) pertence a um grupo de enzimas que reconhecem especificamente a prolina dentro das cadeias peptídicas, atuando em praticamente todos os substratos que contenham este aminoácido. A PEP atua nas ligações peptidil prolil-peptídeo e peptidil prolil-aminoácidos da porção carboxil da prolina (WALTER *et al.*, 1980). Desta forma, sua ação possui relevante papel fisiológico por levar à inativação ou biotransformação de vários peptídeos (angiotensina, bradicinina, vasopressina, luberina e substância P) e proteínas. Portanto, no SRA, a PEP participa formando a Ang-(1-7) tanto a partir da Ang II quanto da Ang I (SANTOS & SAMPAIO, 2002).



Dentre as carboxipeptidases que hidrolisam a Ang I e a Ang II merece destaque a prolil-carboxipeptidase, que parece estar envolvida de forma importante na ativação da pré-caliceína plasmática.

Como já mencionado, o mediador primário e principal efector do SRA é a Ang II; devido à diversidade e potência de suas ações. Responsável pela estimulação de uma variedade de respostas fisiológicas, a Ang II participa da regulação da pressão arterial e da função renal (GRAVAS I. & GRAVAS H., 1993), por causar vasoconstrição tanto direta quanto indiretamente ao estimular receptores AT<sub>1</sub> presentes na vasculatura, e por aumentar o tônus simpático e a liberação de vasopressina. Cronicamente, ele regula a pressão sanguínea modulando a reabsorção de sal e água de forma direta, através da estimulação de receptores AT<sub>1</sub> no rim, ou, de maneira indireta, estimulando a produção e liberação de aldosterona das glândulas adrenais, ou a sensação de sede no sistema nervoso central (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

A Ang II tem ações importantes em múltiplos níveis de funcionamento cardíaco, incluindo efeito trófico, aumento do inotropismo e cronotropismo, efeito pró-arritmogênico e abertura de canais iônicos. Os efeitos da Ang II na hipertrofia cardíaca e na apoptose dos cardiomiócitos parece envolver tanto receptores AT<sub>1</sub> quanto AT<sub>2</sub> (KIM & IWAO, 2000).

Na célula, a Ang II modula a contração, regula o crescimento celular, apoptose, diferenciação, influencia a migração celular e a deposição de matriz extracelular, é pró-inflamatória, estimula a formação de outros fatores de crescimento [exemplo: fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF)] e vasoconstritores (ET-1) (TOUYZ & BERRY, 2001).

A descoberta de antagonistas específicos para Ang II confirmou a existência de vários subtipos de receptores para esta, e, pelo menos, dois sub-tipos de receptores



foram evidenciados e classificados em sub-tipos AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (GASPARO *et al.*, 2000). Com base em vários estudos de “binding”, foi proposta a designação de AT<sub>1</sub> para os receptores inibidos pelo Losartan (Dup753, MK954), e AT<sub>2</sub>, para os receptores inibidos pelo PD123177 e seus análogos (THURMAN & SCHRIER, 2003). Os receptores AT<sub>1</sub> foram identificados no rim, coração, células musculares lisas vasculares, cérebro, glândula adrenal, plaquetas, adipócitos e placenta (TIMMERMANS *et al.*, 1993). Estes dois sub-tipos compartilham apenas 34% de homologia e tem vias de transdução de sinais distintas (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

Os receptores AT<sub>1</sub> são responsáveis pelos efeitos clássicos do SRA, como: a vasoconstrição, a retenção renal de sal e água, o controle osmolar central e a estimulação do crescimento celular. Os receptores AT<sub>2</sub> são importantes para o desenvolvimento fetal, a inibição do crescimento celular e processos de diferenciação (CSIKOS *et al.*, 1998). Nos tecidos adultos, os receptores AT<sub>2</sub> estão presentes em baixos níveis, principalmente no útero, glândula adrenal, sistema nervoso central, coração e rim (TIMMERMANS *et al.*, 1993). Porém, esses receptores parecem ser reexpressos na hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio, e lesão vascular (OHKUBO *et al.*, 1997). Estes efeitos são determinados por uma série de eventos bioquímicos intracelulares e uma complexa rede de transdução de sinais que contribuem para a resposta celular final (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

A Ang II exerce a maior parte de suas funções conhecidas através da interação com o receptor do tipo AT<sub>1</sub> (THURMAN & SCHRIER, 2003), o qual faz parte da família dos receptores de sete domínios transmembrana, ligados à proteína G (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

Em um estudo recente, SANTOS *et al.* (2003), descreveram a existência de um receptor distinto para Ang (1-7) ao demonstrar que a deleção genética do receptor

acoplado à proteína G, codificado pelo protooncogene Mas abole a ligação da Ang (1-7) nos rins de camundongo. Por conseguinte, em camundongos deficientes do receptor Mas, a ação antidiurética da Ang (1-7) foi completamente abolida após uma sobrecarga aguda de água. Nesse estudo também foi evidenciado que Ang (1-7) liga-se a células transfectadas com Mas e causa liberação de ácido araquidônico. Além disso, aortas com deficiência neste receptor perdem sua resposta de relaxamento induzida pela Ang (1-7) e fornecem uma base molecular clara para as ações fisiológicas desse peptídeo biologicamente ativo (SANTOS *et al.*, 2003 a).

## 1.2 - BLOQUEIO DAS AÇÕES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O desenvolvimento de sondas farmacológicas que bloqueiam o SRA ajudou a definir a contribuição desse sistema para o controle da pressão sanguínea e a patogênese de doenças tais como a hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica (BRUNNER *et al.*, 1971).

Não surpreendentemente, o bloqueio farmacológico do SRA diminui a pressão arterial sob condições fisiopatológicas nas quais este sistema está ativado, tais como hipovolemia e depleção de sódio. Além disso, o bloqueio em longo prazo do SRA é útil também para o tratamento da hipertensão essencial humana e algumas formas de hipertensão experimental na qual a atividade da renina plasmática não está elevada (COLLISTER *et al.*, 1996).

Várias abordagens terapêuticas que bloqueiam o SRA tem sido empregadas com sucesso para diminuir a pressão sanguínea elevada, dentre estas, incluem-se: o bloqueio de  $\beta$ -adrenoreceptores, o qual inibe a liberação de renina; o uso de inibidores de ECA, os quais previnem a formação de Ang II a partir de Ang I; e os antagonistas de

receptores de aldosterona, os quais previnem a ação da aldosterona (MCINTYRE *et al.*, 1997)

### **1.2.1. INIBIDORES DE ECA**

O efeito benéfico do bloqueio do SRA foi primeiramente mostrado para os inibidores de ECA, tais como captopril, quinapril, enalapril, e ramipril em pacientes com doença isquêmica do coração e infarto pós-miocardio (MI), numa variedade de ensaios clínicos de larga escala.

Embora, os inibidores de ECA sejam drogas altamente efetivas, é hoje reconhecido que outras enzimas tais como quimase, catepsina G, tPA, tonina elastase, e outras também geram Ang II (SCHMIDT & SCHIEFFER, 2003), não suprimindo completamente a formação da Ang II. Um bloqueio da ECA está também associado com uma potenciação das cininas endógenas, um provável mecanismo para explicar os efeitos desejáveis dos inibidores de ECA, tal como proteção dos órgãos, mas também associado com efeitos indesejáveis, como a tosse seca (SCHMIDT & SCHIEFFER, 2003).

### **1.2.2 - ANTAGONISTAS DE RECEPTOR AT<sub>1</sub>**

Dentre os mecanismos de inibição do SRA, a inibição especialmente do receptor AT<sub>1</sub>, é uma poderosa ferramenta para controlar não apenas a pressão sanguínea, mas também processos mal adaptativos vasculares e, portanto prevenir doenças cardiovasculares (SCHMIDT & SCHIEFFER, 2003).

Neste contexto, os bloqueadores de receptores de angiotensinas têm uma afinidade muito maior para receptores AT<sub>1</sub> que para AT<sub>2</sub> (da ordem de magnitude de 4 a 5 vezes). Porém, o tratamento com bloqueadores de AT<sub>1</sub> pode resultar em elevações nos

níveis de Ang II circulantes, o que por sua vez, causaria também, estimulação dos receptores  $AT_2$  (THURMAN & SCHRIER, 2003).

Em estudos realizados em indivíduos normotensos foi consistentemente demonstrado, que os antagonistas de receptores  $AT_1$  bloquearam a resposta pressora da Ang II exógena de forma dose-dependente (CHRISTEN *et al.*, 1991).

O primeiro antagonista não peptídico descrito para o receptor  $AT_1$  foi o Losartan (figura 3), o qual mostrou ser 10000x mais seletivo para receptor  $AT_1$  que para receptor  $AT_2$  (SCHMIDT & SCHIEFFER, 2003).

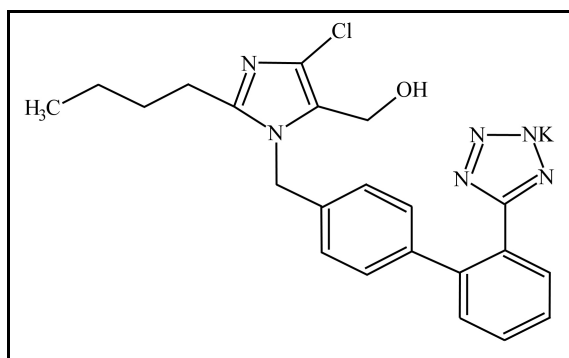


FIGURA 3 - Estrutura do Losartan potássico

*In vitro*, Losartan compete com a Ang II pela ligação ao receptor  $AT_1$ . A concentração que inibe 50% da ligação da Ang II ( $IC_{50}$ ) é 20nmol/L. O Losartan tem um metabólito ativo, o EXP3174 que quando administrado intravenosamente é dez a vinte vezes mais potente que o Losartan e tem uma ação com duração mais longa que o Losartan. Entretanto, a biodisponibilidade oral do EXP3174 é muito baixa. O Losartan e seus metabólitos são excretados pelo rim e bile.

A utilidade fisiológica de antagonistas dos receptores da Ang II como agente antihipertensivo tal como Losartan, têm sido demonstrada em modelos animais de hipertensão induzida geneticamente e experimentalmente tanto quanto em pacientes com hipertensão essencial humana (TIMMERMANS *et al.*, 1993).

### **1.3 - FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS BASEADAS EM CICLODEXTRINAS E POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS**

Muitos processos têm sido desenvolvidos para a obtenção de fármacos mais eficientes e/ou menos tóxicos para o tratamento da hipertensão arterial, doença de grande incidência no mundo atual. Entretanto esses processos ainda produzem fármacos que apresentam efeitos colaterais e alguns com baixa biodisponibilidade (VERGER *et al.*, 1998; ABUBAKR *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, diversos sistemas de administração de fármacos têm surgido com a finalidade de modelar a cinética de liberação, melhorar a absorção, aumentar a estabilidade do fármaco ou vetorizá-lo para uma determinada população celular. Desta maneira surgem as composições poliméricas, as ciclodextrinas, os lipossomas, as emulsões, e as múltiplas emulsões, que servem como carreadores dos princípios ativos, entre outras estratégias. Essas formulações podem ser administradas vias injeção intramusculares, intravenosas, subcutânea, além de formulação oral, inalação ou como dispositivos que possam ser implantados ou injetados (SINISTERRA *et al.*, 2002).

### 1.3.1 - CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CD), também chamadas de cicloamiloses, cicloglucanos e ciclomalto-oligosés, são oligossacarídeos cíclicos obtidos pela primeira vez como produtos de degradação do amido. Foram isoladas pela primeira vez em 1891 por Villier, mas somente em 1904 Schardinger as caracterizou (LOFTSSON, 2001).

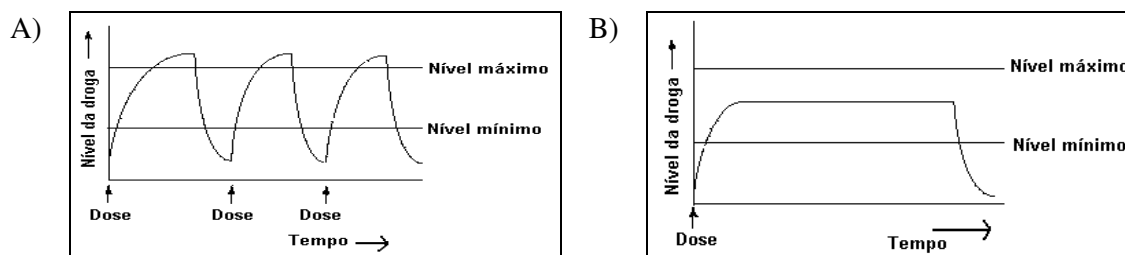
A capacidade das ciclodextrinas de formar compostos de inclusão baseia-se na versatilidade de suas propriedades físicas e químicas, as quais possibilitam interações intermoleculares do tipo hospede-hospedeiro com outras moléculas sendo que, ligações covalentes não são estabelecidas entre as espécies (UEKAMA *et al.*, 1997; DUCHENE, 1999).

As ciclodextrinas mais comuns são a  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrina, consistindo de seis, sete e oito unidades de glicose. A  $\alpha$ -ciclodextrina causa pequena irritação após injeção intramuscular e 2 e 3% é absorvido após administração oral. Nenhum metabolismo é observado no intestino grosso e é degradada somente pela flora intestinal do colon (Loftsson, 1998). A  $\beta$ -ciclodextrina é menos irritante do que a  $\alpha$ -ciclodextrina e é muito pouco absorvida no intestino grosso (1-2%) após administração oral sendo metabolizada por bactérias no cólon. Correntemente, a  $\beta$ -ciclodextrina é a mais usada em formulações farmacêuticas e assim, provavelmente, a mais estudada. Como dito anteriormente, é degradada no cólon e a fermentação pode levar à produção de gás e diarreia (LOFTSSON, 1998). A  $\gamma$ -ciclodextrina apresenta insignificante irritação após injeção i.m., é rapidamente degradada no intestino grosso por enzimas intestinais e pequena quantidade é absorvida após administração oral (LOFTSSON, 1998).

## 1.4 - SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Do ponto de vista da otimização da farmacoterapia, a liberação do fármaco deveria ser controlada de acordo com a proposta terapêutica e as propriedades farmacológicas da substância ativa. Portanto, liberação apropriada do fármaco é de crítica importância no cumprimento da sua eficácia terapêutica. A fim de designar mais avanços na forma de dosagem, vários tipos de materiais carreadores estão sendo desenvolvidos para entregar a quantidade necessária do fármaco ao sítio alvo pelo período necessário de tempo, ambos eficientemente e precisamente. (HIRAYAMA & UEKAMA, 1999).

Em 1952 foi introduzida no mercado a primeira cápsula de sistema de liberação controlada, a qual foi denominada de ‘timed release’, sendo que posteriormente todos os sistemas de liberação controlada (‘prolonged, timed e extended release’) foram denominados simplesmente ‘controlled-release systems’ (ROBINSON, 1997). Somente em 1960 iniciou-se, de maneira sistemática, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, na tentativa de modular a farmacocinética dos fármacos no organismo, principalmente pelo trato gastrointestinal, e melhorar as propriedades físico-químicas dos mesmos. Hoje se tem que, o mercado farmacêutico aplica aproximadamente US\$ 250 bilhões no desenvolvimento de novas formulações, sendo que 10% são aplicados à biotecnologia e 10% no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, podendo chegar a 20% em 2005.



**FIGURA 4** - Níveis da droga no plasma (A) dosagem tradicional e (B) liberação prolongada (DE PAULA, 2004).

A descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco consomem aproximadamente US\$ 400-650 milhões, consumindo em torno de 10 anos, além dos riscos associados aos processos. Em contrapartida, os sistemas de liberação controlada são obtidos com aproximadamente 20% do custo anterior e na metade do tempo, permitindo às indústrias farmacêuticas maximizarem o retorno de seus investimentos, melhorando os fármacos já existentes no mercado, com melhor eficácia e maior adesão dos pacientes ao tratamento (PANCHAGNULA *et al.*, 2001). Por décadas, fármacos utilizados nos mais variados tratamentos são administrados em sistemas convencionais de liberação, compreendendo as soluções, suspensões, comprimidos, etc. Em sua maioria, os esquemas terapêuticos empregando estes sistemas convencionais, requerem várias administrações em um curto período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo (figura 4). Algumas vezes, tais níveis não são alcançados, ou seja, o tratamento não exibe resposta farmacológica, localizando-se abaixo do nível terapêutico mínimo ou apresentando exacerbação dos efeitos adversos, localizando-se acima do nível terapêutico máximo, como na figura 4A (LAURENCIN, *et al.*, 1987).

A ação prolongada de fármacos pode ser conseguida basicamente de duas maneiras: (1) por modificações estruturais do fármaco (ex: pró-fármaco) ou (2) incorporação do fármaco em um sistema que seja capaz de controlar sua liberação (JAIN *et al.*, 1998).

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados em quatro classes: oral, transdérmico, injetável e inalável. Sistemas tipicamente orais apresentam fácil formulação, mas não fornecem um perfil de liberação maior do que 24 horas. Por outro lado, sistemas transdérmicos fornecem um perfil de liberação prolongada por um



período de semanas (LANGER, 2001). Contudo, a maioria dos fármacos não é capaz de atravessar a barreira do extrato córneo, devido ao seu caráter lipofílico (LANGER, 2001).

### **1.4.1 - POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS**

Uma alternativa para se obter um sistema de liberação controlada consiste na utilização de sistemas poliméricos. Estes sistemas têm a vantagem de proporcionar o encapsulamento de fármacos, isolando-os do meio externo por uma barreira física. Tal barreira física é formada por um polímero, que em contato com fluidos biológicos, por mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos, irá se dissolver, desintegrar ou sofrer processo de degradação liberando a forma ativa e tornando-a disponível (LIMA *et al.*, 1999). Nestes sistemas, os fármacos são incorporados em uma matriz polimérica ou em microcápsulas, baseando-se no encapsulamento dos fármacos em microesferas, as quais liberam o fármaco no interior do organismo, em pequenas e controláveis doses diárias, durante dias, meses ou até anos (LIMA *et al.*, 1999).

A liberação do fármaco pode ser feita por quatro mecanismos: (1) difusão do fármaco através da matriz polimérica, (2) reação química ou enzimática com degradação do sistema, (3) a partir da ativação do solvente através de osmose ou dilatação do sistema e (4) hidrólise do polímero num processo chamado de bioerosão.

No primeiro caso, a etapa determinante do processo de liberação do fármaco é a difusão da mesma através da matriz polimérica, devido ao gradiente de concentração.

Segundo LANGER *et al.* (1984), geralmente os dispositivos controlados por difusão são formados por uma parte central (reservatório) revestida por um material polimérico insolúvel em água, onde a difusão do fármaco ocorre através da matriz polimérica. A difusão do fármaco dependerá da solubilidade deste e da porosidade da matriz polimérica, onde fármacos mais hidrofóbicos e matrizes com alta porosidade

apresentam maior velocidade de difusão, facilitando a passagem do fármaco para o meio externo. Na liberação controlada por osmose, o sistema é constituído por uma matriz, um eletrólito e o fármaco a ser liberado. A matriz, contendo pequenos orifícios, permite a difusão de água, mas não do eletrólito e do fármaco. Quando o dispositivo é colocado em contato com água ou fluido biológico, haverá um fluxo de água para o interior da matriz, devido a diferença de pressão osmótica.

Este tipo de sistema é capaz de produzir uma liberação com cinética de ordem zero, ou seja, com uma velocidade constante em função do tempo, por um longo período, além de liberar o fármaco com uma maior taxa do que aquela conseguida pelos sistemas controlados por difusão. Adicionalmente, este sistema é aplicável a fármacos com diversas composições e massa molar, o que não é conseguido através do mecanismo de difusão.

Nos sistemas controlados por solvente, o agente ativo está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e não se difunde através da matriz. Para que ocorra a difusão, o polímero deve-se intumescer (por exemplo, com água), abaixando a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do material polimérico, permitindo que o fármaco contido na matriz possa se difundir para o meio externo.

Dentre os sistemas microencapsulados, as microesferas são compreendidas como um sistema matricial de diâmetro compreendido entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . Neste sistema matricial, o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, e a liberação do fármaco se dá de forma contínua ou pulsátil, iniciando tão logo estas microesferas entrem em contato com fluidos biológicos onde, por difusão através da matriz polimérica ou bioerosão, o fármaco torna-se disponível. Nesse processo a água entra no interior do dispositivo e provoca dissolução do fármaco. A entrada de água leva a formação de poros por onde o fármaco pode se difundir, à medida que a água vai

entrando, o número de poros também aumenta e com isso começa ocorrer erosão do polímero junto com o fármaco (BURGESS *et al.*, 1994).

Muitos polímeros têm sido investigados para o preparo de microesferas, mas somente alguns têm demonstrado real biocompatibilidade. Dentre os polímeros naturais estão as proteínas, o amido e os derivados celulósicos, sendo que as proteínas mais utilizadas são albuminas bovina e humana, colágeno e gelatina. Os polímeros sintéticos podem ser exemplificados pelas poliamidas, poliaminoácidos, poliésteres, polialquilcianocrilatos, poliortoésteres, poliuretanos, poliácridamidas, policaprolactonas e polihidroxicanoatos. Dentre os polímeros sintéticos, tem merecido destaque os poliésteres alifáticos, como o poli-ácido lático (PLA), poli-ácido glicólico (PLG) e especialmente os copolímeros do ácido lático e glicólico que são denominados ácido poli lático-glicólico (PLGA), figura 5. Os poliésteres sofrem degradação homogênea devido à hidrólise espontânea dos grupos ésteres, impedindo assim a degradação na superfície, dificultando a permeação do fármaco sobre a matriz polimérica (Cohen *et al.*, 1991).

O PGA (figura 5A), é altamente cristalino e o mais hidrofílico entre eles e apresenta tempo de degradação em torno de 2-3 meses. O PLA (figura 5B) é amorfo, com tempo de degradação em torno de 12-16 meses, enquanto o copolímero PLGA (figura 5C) também é amorfo e possui tempo de degradação em torno de 1-6 meses dependendo da porcentagem dos polímeros PGA e PLA. Estes poliésteres são degradados por hidrólise e esta pode ser catalisada por ácidos e bases. Portanto, o pH fisiológico é constante em torno de 7,4 e a variação de temperatura é muito pequena, permanecendo em torno de 37°C (JALIL *et al.*, 1990).

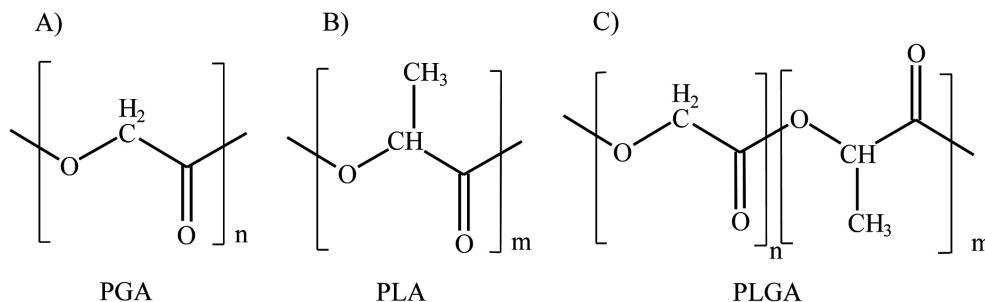


FIGURA 5 - Estrutura química do PGA (A), PLA (B) e PLGA (C).

#### 1.4.2 - FORMAS CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS DE ADMINISTRAÇÃO DE AGENTES ANTIHIPERTENSIVOS.

Na literatura foram encontradas algumas formulações de agentes antihipertensivos usando os sistemas de liberação controlada, mas nenhuma utilizando a combinação entre as ciclodextrinas e os polímeros biodegradáveis. GUITTARD *et al.* (1993), descreveu uma formulação composta por acetato de celulose, polivinilpirrolidone e tri-propilcitrato, capaz de manter uma liberação sustentada de Captopril por 48 horas. MAINCENT *et al.* (2000), prepararam micropartículas (190-350µm) de policaprolactona contendo uma mistura de Nifedipine (lipofílico) e Propanolol (hidrofílico), com uma eficiência de encapsulação de 37% para o Nifedipine e 91% para o Propanolol. A liberação da Nifedipine foi mais bem controlada, uma vez que a liberação do Propanolol apresentou 'burst effect', ou seja, o fármaco liberado apresentou altas concentrações nas primeiras horas de liberação. O perfil de liberação do Propanolol mostrou que em 8 horas, 70% do fármaco foi liberado e para a Nifedipine, somente 30% do fármaco foi liberado nas primeiras 8 horas.

No campo da fisiologia, a utilização de substâncias sintéticas ou não, que funcionem como agonistas ou antagonistas de receptores é uma prática muito usada para investigar o papel dessas substâncias dentro dos vários sistemas fisiológicos.

Atualmente, quando algum estudo visa determinar os efeitos do bloqueio crônico do SRA *in vivo*, pode-se utilizar a administração oral de doses diárias de algum fármaco que pertença, por exemplo, a classe dos antagonistas de AT<sub>1</sub> da Ang II, ou então esse mesmo fármaco pode ser administrado por via subcutânea com o auxílio de minibombas osmóticas de infusão, que caracteristicamente liberam a droga de forma lenta e controlada na corrente sanguínea.

Porém, experimentalmente, as formas citadas acima de administração de drogas apresentam desvantagens que limitam sua utilização: a administração de doses diárias de algum fármaco faz com que ocorram picos e quedas de concentração da mesma no sangue e isso pode comprometer a eficácia farmacológica dessa substância. Por outro lado, as minibombas conseguem manter o nível terapêutico do f na circulação devido ao seu mecanismo de liberação controlada, no entanto, seu uso rotineiro em laboratório é por muitas vezes inviável por causa do alto custo desses dispositivos. Assim, seria importante o desenvolvimento de novas metodologias que permitam a manutenção da droga em concentrações ótimas na corrente sanguínea durante longos períodos de tempo e que, além disso, possua um baixo custo.

## **2.0 - OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

A proposta desse trabalho foi avaliar a viabilidade do uso associado de um antagonista de receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II, o Losartan, com um polímero biodegradável, o PLGA (ácido poli lático glicólico) para estudos sobre os efeitos do sistema renina-angiotensina em ratos normotensos.

### **2.2 - OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> da Angiotensina II em ratos Wistar induzido pelo tratamento agudo e crônico com formulação Losartan/polímero biodegradável e Losartan/ $\beta$ -CD/polímero biodegradável, administradas por via subcutânea.

## **3.0 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 - ANIMAIS**

Para realização dos experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos pesando aproximadamente 200-300g com idade entre 16-20 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### **3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.2.1 - PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

##### **3.2.1.1 - CIRURGIA PARA IMPLANTE DE CÂNULAS NA VEIA E ARTÉRIA FEMORAL**

Sob anestesia geral inalatória com éter, foi realizada uma cirurgia para o implante de um cateter de polietileno (PE10/PE50) na veia femoral para administração de drogas. Esse cateter foi preenchido com solução fisiológica e sua extremidade distal foi ocluída por um pino de metal. Em seguida, esse cateter foi introduzido na veia femoral onde foi fixado. Para possibilitar o manuseio do animal acordado e com livre movimentação, a cânula foi exteriorizada no dorso do animal através do tecido subcutâneo, com o auxílio de um trocater.

O mesmo procedimento foi realizado para o implante da cânula arterial, porém o implante dessa cânula teve como objetivo possibilitar o registro de parâmetros cardiovasculares.

Após a cirurgia, o animal foi alojado em gaiola individual, com água e ração à vontade, na sala de recuperação cirúrgica localizada no laboratório de hipertensão do departamento de Fisiologia até a realização dos experimentos.

### 3.2.1.2 - MEDIDA DA PRESSÃO DE CAUDA POR PLETISMOGRAFIA

Um sistema de pletismografia de cauda digital (RTBP: Kent Scientific Co) foi utilizado para medir a pressão sistólica (PS) dos animais antes e durante o tratamento, em intervalos regulares (figura 6). Nesse método, a artéria da cauda é brevemente ocluída com o auxílio de um pequeno cuff, além de um sensor que também é colocado na cauda do animal. Esse sensor é capaz de sentir a pulsação arterial e envia o sinal analógico para um conversor analógico digital. O sinal digital é então processado por software apropriado (CODAS).

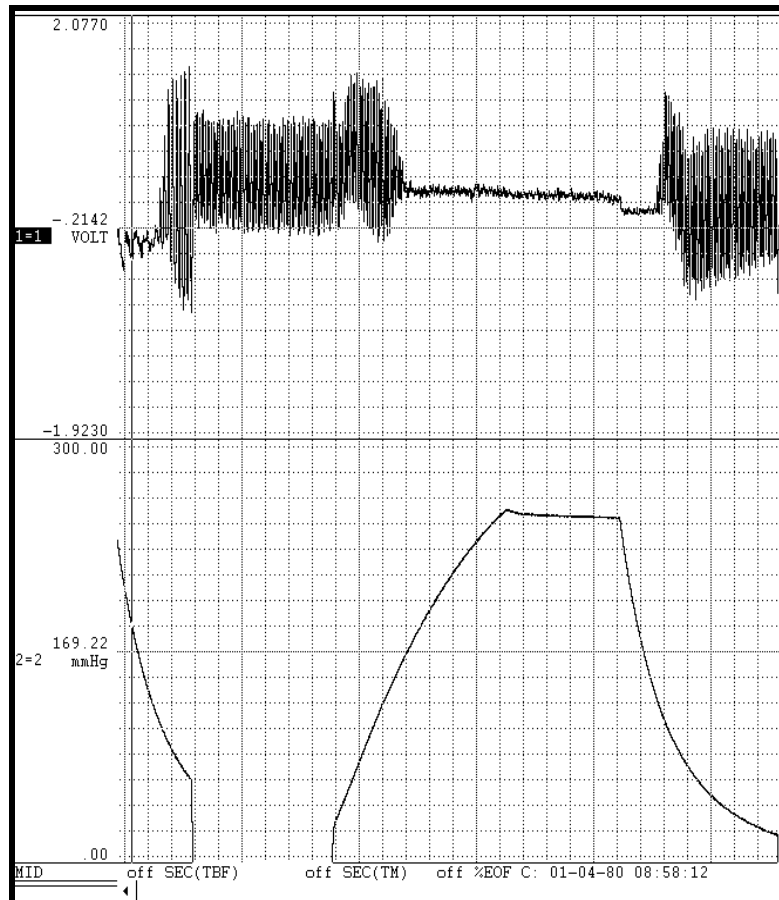


FIGURA 6 - Figura ilustrativa de uma medida da pressão sistólica obtida através do método da pletismografia de cauda digital.



### **3.2.1.3 - REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES: PAP, PAM E FC.**

Os animais foram conectados através da cânula inserida na artéria femoral a um transdutor de pressão conectado a um sistema de registro para obtenção dos parâmetros cardiovasculares (BIOPAC Systems Inc Santa Bárbara, California) 24 horas após a canulação.

### **3.2.1.4 - PREPARO DAS MICROESFERAS DE PLGA**

Neste trabalho, a técnica da dupla emulsão adaptada (LANGER *et al.*, 1991) foi utilizada para o preparo das microesferas de PLGA. Os dispositivos de liberação controlada de Losartan sob a forma de pastilha de microesferas de PLGA foram preparados de acordo com o método descrito por DE PAULA (2004).

### **3.2.1.5 - CIRURGIA PARA IMPLANTE SUBCUTÂNEO DO DISPOSITIVO DE POLÍMERO BIODEGRADÁVEL/LOSARTAN EM FORMA DE PASTILHA.**

Sob anestesia geral inalatória com éter, o local a ser operado, na região cervico-dorsal do animal, foi tricotomizado e esterilizado com álcool iodado. Com o animal em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão horizontal, de aproximadamente 10 mm na altura da região cervical. Em seguida, uma pinça hemostática foi introduzida subcutaneamente pelo corte por aproximadamente 8 cm em direção caudal e posteriormente retirada. Com o auxílio da pinça, o dispositivo a ser implantado foi introduzido pelo corte em direção caudal. Dois ou três pontos individuais foram feitos para a completa sutura da incisão. Para evitar infecções, 0,1 mL do antibiótico pentabiótico foi aplicado topicamente sobre a sutura e também intramuscularmente em uma das patas posteriores do animal.

Após a cirurgia, o animal foi alojado em gaiola individual, com água e ração à vontade, na sala de recuperação cirúrgica localizada no laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e 24 horas após, foi relocado no biotério, sob temperatura de 20-24°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, onde foi mantido até a realização dos experimentos.

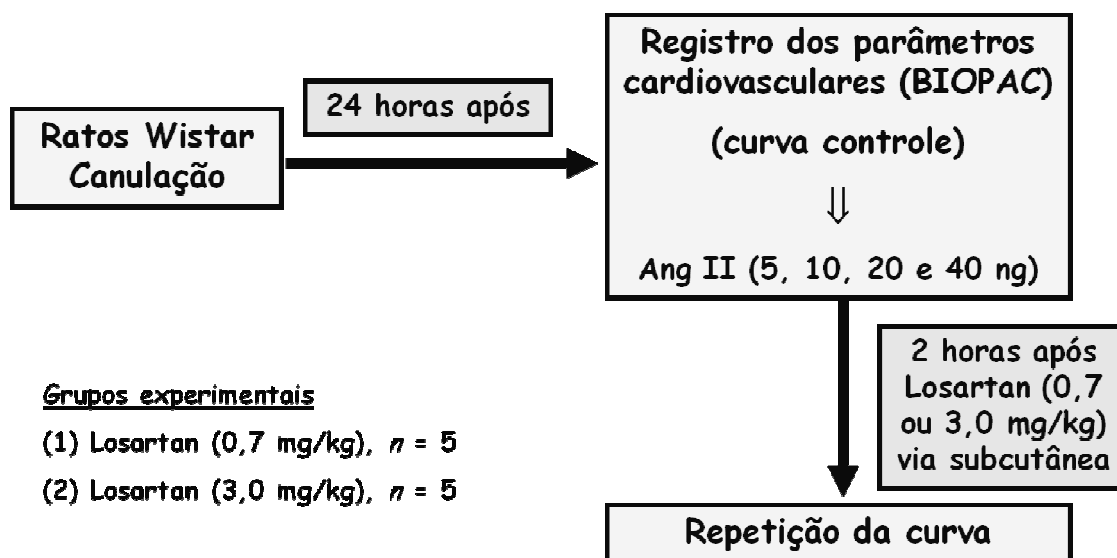
#### **3.2.1.6 - ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN POR VIA SUBCUTÂNEA**

Alguns animais foram submetidos a uma injeção subcutânea de Losartan numa concentração correspondente a presente na pastilha ou na suspensão do polímero. Essa droga foi diluída em salina estéril para um volume suficiente de 1000 µl, o qual foi injetado no subcutâneo do animal com uma seringa usada para aplicação de insulina. As concentrações do Losartan variaram de acordo com o protocolo estudado

### **3.3 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.3.1 - PROTOCOLO 1 - TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE LOSARTAN.**

Com a finalidade de demonstrar a eficácia do Losartan, nas doses utilizadas para bloquear o efeito pressor da Angiotensina II, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para canulação 24 horas antes dos experimentos. Foram administradas doses crescentes de Ang II (5, 10, 20, 40ng/0.1ml injeção i.v.) antes e 2 horas após administração de Losartan (3,0 e 0,7mg/kg).

**SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL****3.3.2 - PROTOCOLO 2 - TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM RATOS WISTAR , 2, 6, 12, 24, 36, E 48 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE UMA SUSPENSÃO DE MICROESFERAS DE PLGA/LOSARTAN OU LOSARTAN/ $\beta$ -CD/PLGA - EFEITO AGUDO.**

No presente trabalho foram testados dois tipos diferentes de formulação para liberação controlada, ambos na base PLGA. Um é a associação do Losartan livre a este polímero e o outro é composto por Losartan incluído em  $\beta$ -CD formando um composto de inclusão (CI) que, por sua vez, foi encapsulado por microesferas de PLGA. Para avaliar o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar 2, 6, 12, 24, 36, e 48 horas após administração de uma suspensão de microesferas de PLGA/PLGA/Losartan ou CI/PLGA/ $\beta$ -CD foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

(1) grupo controle Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma solução de Losartan nas doses de 3,0 mg/kg;

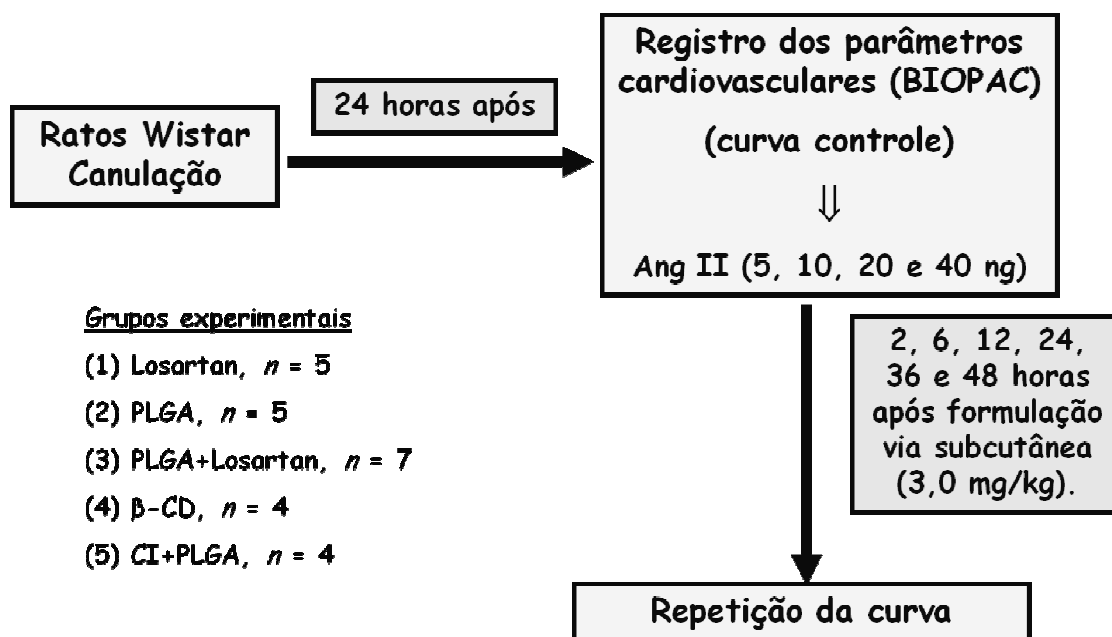
(2) grupo controle PLGA: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão com microesferas de PLGA;

(3) grupo tratado com PLGA/Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão com o Losartan na dose de 3,0 mg/kg encapsulado nas microesferas de PLGA.

(4) grupo controle  $\beta$ -CD: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão de  $\beta$ -ciclodextrina;

(5) grupo tratado com CI/PLGA: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão de Losartan na dose de 3,0 mg/kg incluída na  $\beta$ -ciclodextrina e encapsulada nas microesferas de PLGA.

Este protocolo teve como finalidade avaliar a capacidade de liberação do Losartan pelo polímero PLGA ou quando incluído na  $\beta$ -CD e associado ao polímero, num período de 48 horas, através da realização de curvas concentração-resposta para Ang II 2, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a injeção subcutânea. Os animais foram submetidos ao procedimento de canulação e no dia seguinte deu-se início aos experimentos. Curvas concentração-resposta foram realizadas em todos os animais antes e após a administração da formulação. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por sobrecarga de anestésico.

**SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL****3.3.3 - PROTOCOLO 3 - TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM RATOS WISTAR OITO DIAS APÓS O TRATAMENTO COM PLGA/LOSARTAN SOB A FORMA DE PASTILHA OU SUSPENSÃO DE MICROESFERAS – EFEITO CRÔNICO.**

Para avaliar o bloqueio do efeito pressor da Ang II em ratos Wistar 8 dias após o tratamento com PLGA/PLGA/Losartan sob a forma de pastilha ou suspensão de microesferas foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

**TRATAMENTO COM AS MICROESFERAS EM SUSPENSÃO**

(1) grupo controle Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma solução da droga na dose de 3,0 mg/kg;

(2) grupo controle PLGA: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão com microesferas de PLGA;

(3) grupo tratado com PLGA/Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma suspensão com a droga na dose de 3,0 mg/kg encapsulada nas microesferas de PLGA.

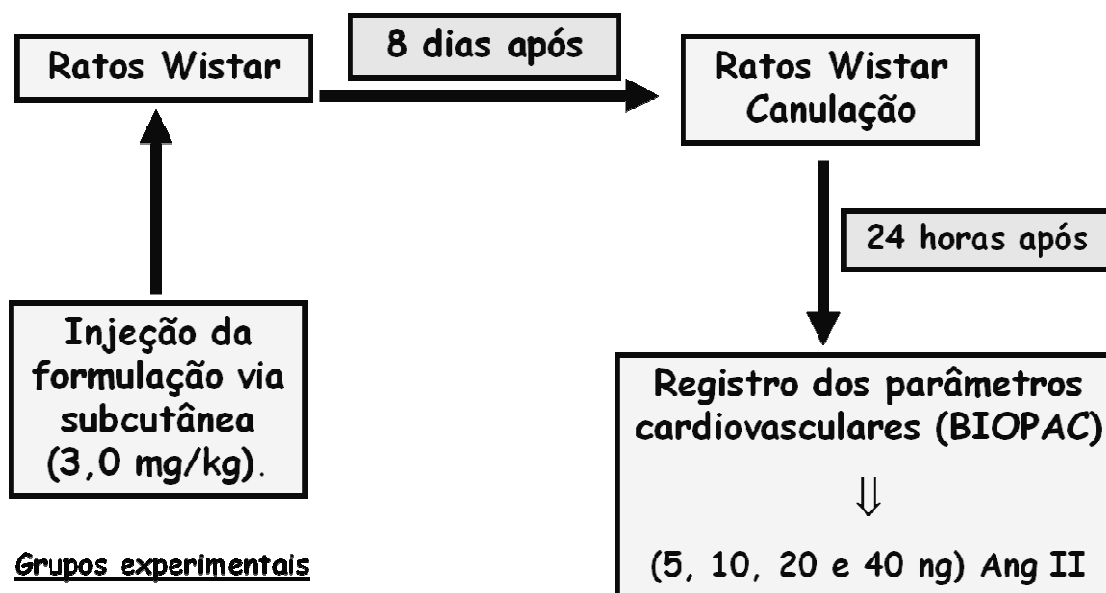
#### **TRATAMENTO COM AS MICROESFERAS SOB A FORMA DE PASTILHA**

(1) grupo controle Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma solução de Losartan nas doses de 0,7 ou 3,0 mg/kg;

(2) grupo controle PLGA: animais submetidos à cirurgia para implante subcutâneo do dispositivo composto por microesferas de PLGA;

(3) grupo tratado com PLGA/Losartan: animais submetidos à cirurgia para implante subcutâneo do dispositivo composto por Losartan nas doses de 0,7 ou 3,0 mg/kg encapsulado pelo polímero PLGA.

Antes do início do experimento os animais foram submetidos a três sessões de medidas da PS pelo método da pletismografia de cauda com intervalos regulares entre elas. A terceira medida antes do implante do dispositivo ou da injeção subcutânea de Losartan correspondeu à primeira medida experimental e as medidas subsequentes também ocorreram em intervalos regulares de tempo. Ao final do período de tratamento (8 dias), os animais foram submetidos à cirurgia para canulação e após 24 horas, foram realizadas injeções de doses crescentes de Angiotensina II (5, 10, 20 e 40ng/0.1ml). Apenas os animais tratados com a formulação PLGA/Losartan/PLGA sob a forma de pastilha tiveram o acompanhamento da PS pela pletismografia de cauda. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por sobrecarga de anestésico.

**SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL****Grupos experimentais**

- (1) Losartan,  $n = 4$
- (2) PLGA,  $n = 4$
- (3) PLGA+Losartan,  $n = 6$

**3.3.4 - PROTOCOLO 4 - TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM RATOS WISTAR 8 OU 21 DIAS APÓS IMPLANTAÇÃO DE DISPOSITIVO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE CI/PLGA SOB A FORMA PASTILHA.**

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a ação da  $\beta$ -CD e do PLGA na taxa de liberação do Losartan. Os procedimentos experimentais executados nesse protocolo foram os mesmos do Protocolo 3. Porém, neste, foram usados dispositivos em forma de pastilha compostos por CI, no qual o Losartan é incluído em CD e encapsulado pelo polímero PLGA. Para avaliar o bloqueio do efeito pressor da Ang II em ratos Wistar 8 ou 21 dias após o tratamento com CI/PLGA/ $\beta$ -CD/PLGA sob a forma de pastilha foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

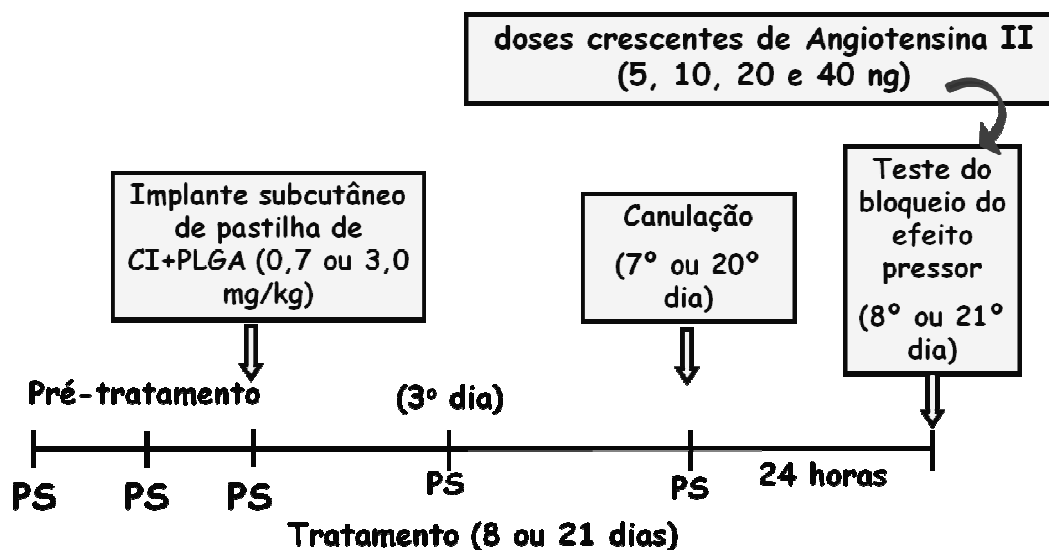
- (1) grupo controle Losartan: animais submetidos à injeção subcutânea de uma solução de Losartan nas doses de 0,7 ou 3,0 mg/kg;

(2) grupo controle  $\beta$ -CD/PLGA: animais submetidos à cirurgia para implante subcutâneo do dispositivo composto por  $\beta$ -CD encapsulada por microesferas de PLGA;

(3) grupo tratado com CI/PLGA: animais submetidos à cirurgia para implante subcutâneo do dispositivo composto por Losartan na dose de 0,7 ou 3,0 mg/kg incluído em ciclodextrina e encapsulado pelo polímero PLGA.

Nesse protocolo a duração do tratamento foi de 8 dias quando a dose de 0,7 mg/kg de Losartan foi utilizada ou de 21 dias para a dose de 3,0 mg/kg de Losartan. Assim como nos protocolos anteriores, ao final do período de tratamento, os animais foram canulados e após 24 horas foram realizadas injeções de doses crescentes de Angiotensina II (5, 10, 20 e 40ng/0.1ml). Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por sobrecarga de anestésico.



SEQÜÊNCIA EXPERIMENTALGrupos experimentais(8 dias)

- (1) Losartan,  $n = 5$
- (2) PLGA+  $\beta$ -CD,  $n = 4$
- (3) CI+PLGA,  $n = 6$

Grupos experimentais(21 dias)

- (1) Losartan,  $n = 6$
- (2) PLGA+  $\beta$ -CD,  $n = 5$
- (3) CI+PLGA,  $n = 5$

### 3.3.5 - PROTOCOLO 5 – LIBERAÇÃO DO LOSARTAN A PARTIR DE MICROESFERAS DE PLGA/LOSARTAN E CI/PLGA *IN VITRO*.

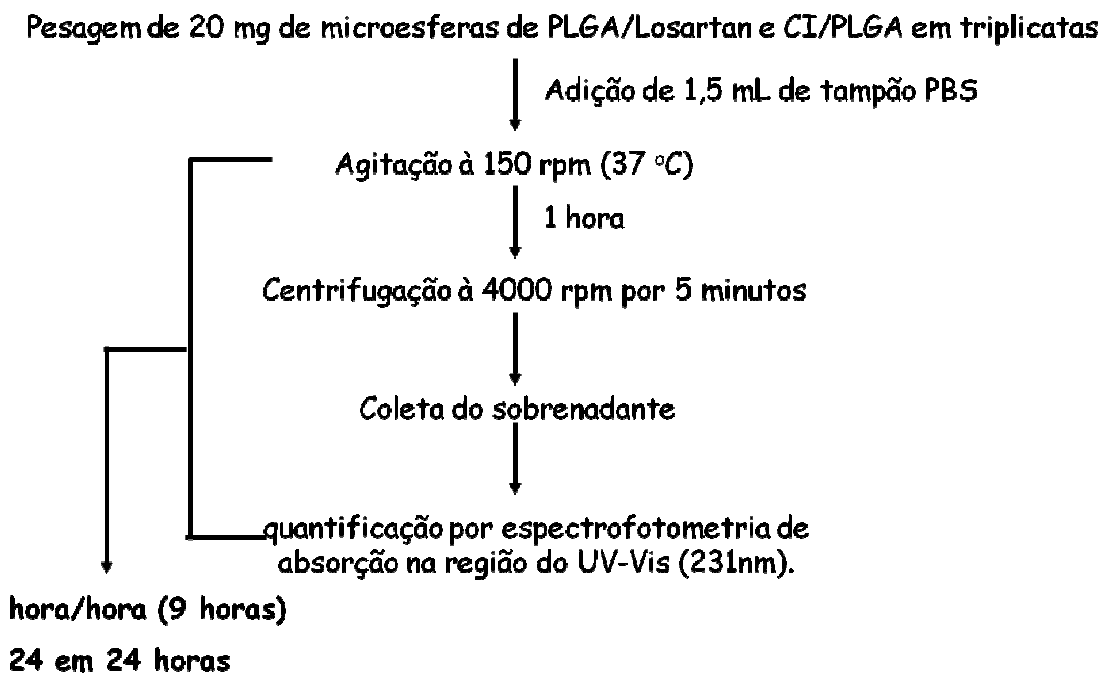
A realização desse protocolo teve como finalidade estudar a cinética de liberação do Losartan a partir de diferentes formulações (Losartan/PLGA e CI/PLGA) a fim de comparar os resultados obtidos nesse experimento com os obtidos nos experimentos agudos *in vivo*.

Para isso, amostras de 20 mg de microesferas de PLGA/Losartan e CI/PLGA foram pesadas em triplicatas e em seguida adicionados 1,5 mL de tampão PBS (pH =7,35) em todos os eppendorfs. As amostras foram então submetidas à agitação numa incubadora de bancada com temperatura constante de 37 °C a uma velocidade de agitação de 150 rpm.

Após 1 hora de incubação a agitação foi interrompida e os tubos centrifugados por 5 minutos a uma velocidade de 4000 rpm. Ao final da centrifugação, todo o sobrenadante foi coletado e acondicionado em um segundo tubo eppendorf, o qual foi estocado sob refrigeração até o momento da quantificação do fármaco por espectrofotometria de absorção na região do UV-Vis (231nm). Aos eppendorfs foram adicionados mais 1,5 mL do tampão PBS e novamente levados para a agitação na incubadora de bancada.

Esse mesmo procedimento foi repetido a cada hora durante as primeiras 9 horas e de 24 em 24 horas até o final do experimento. Adicionalmente verificou-se que o PLGA e a ciclodextrina não absorve luz no comprimento de onda estudado (231nm).

#### SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL



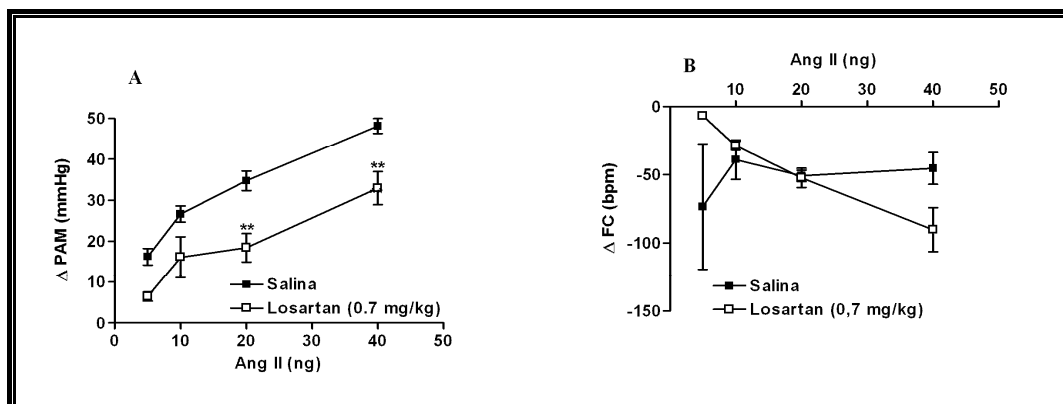
### **3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise dos dados foram utilizados Análise de Variância (Two-way ANOVA, seguida de teste de Bonferroni) e teste T de Student quando apropriado. Os resultados foram analisados usando-se o Software Graph Pad Prism 4.0.

## 4.0 - RESULTADOS

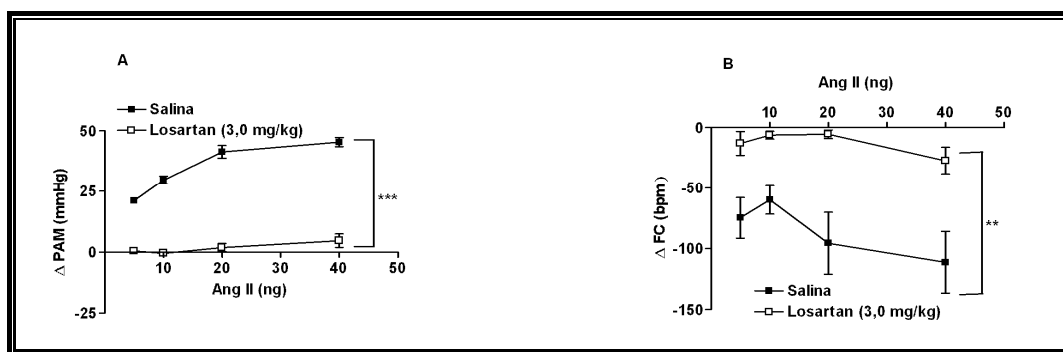
### 4.1 - ALTERAÇÕES AGUDAS DA PAM E FC OBTIDAS DURANTE O TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM ANIMAIS NORMOTENSOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE LOSARTAN.

A eficiência em bloquear o efeito pressor da Ang II nas doses de Losartan utilizadas nesse trabalho foi avaliada através do teste do bloqueio do efeito pressor da Ang II. Dessa forma, foram construídas curvas dose-resposta para Ang II duas horas após a administração do Losartan nas doses de 0,7 ou 3,0 mg/kg. O efeito pressor causado pela dose mais alta de Ang II (40ng/0.1ml) após a injeção subcutânea de salina fisiológica (curva controle) foi de  $48 \pm 1,5$  mmHg e nesses mesmos animais, duas horas após a administração do Losartan na dose de 0,7 mg/kg foi de  $33 \pm 3.3$  mmHg de acordo com o Painel A da figura 7. Com a maior dose de Losartan, o efeito pressor da maior dose de Ang II foi reduzido de  $45 \pm 1.5$  mmHg para  $5 \pm 2.2$  mmHg, duas horas após o tratamento (figura 8, painel A).



**FIGURA 7** - Bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido duas horas após a administração por via subcutânea do Losartan na dose de 0,7 mg/kg em animais normotensos. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca (FC). —■— Curva controle realizada após administração por via subcutânea de uma solução de salina fisiológica,  $n = 5$ ; —□— Curva realizada duas horas após a administração do Losartan por via subcutânea,  $n = 5$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva controle salina.

Esses mesmos experimentos forneceram respostas variáveis para a frequência cardíaca quando a dose de 0,7 mg/kg de Losartan foi utilizada. Assim, nota-se no Painel B da figura 7 que não houve diferenças significativas entre as duas condições testadas, ou seja, o Losartan não foi capaz de afetar a resposta bradicárdica máxima para Ang II duas horas após a sua administração. Quando a dose de 3,0 mg/kg de Losartan foi testada, as respostas bradicárdicas a Ang II foram significativamente atenuadas, em paralelo ao bloqueio do efeito pressor (figura 8, painel B).



**FIGURA 8** - Bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido duas horas após a administração por via subcutânea de Losartan de 3,0mg/kg em animais normotensos. Painel A representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); Painel B representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca (FC). —■—Curva controle realizada após administração por via subcutânea de uma solução de salina fisiológica, n = 5; —□—Curva realizada duas horas após a administração do Losartan por via subcutânea, n = 5. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\* p < 0,01 comparado à curva controle.

## 4.2 - ALTERAÇÕES AGUDAS DA PAM E FC OBTIDAS DURANTE O TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM ANIMAIS NORMOTENSOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE MICROESFERAS DE PLGA/LOSARTAN OU CI/PLGA ADMINISTRADAS POR VIA SUBCUTÂNEA.

### 4.2.1 - SUSPENSÃO DE MICROESFERAS DE PLGA/LOSARTAN EM SALINA.

A curva concentração-resposta para doses crescentes de Angiotensina II (5,10,20,40 ng i.v.) realizadas antes da administração do Losartan (3,0 mg/kg) está representada na figura 9 e mostra que não houve diferenças significativas entre os grupos estudados antes do início do tratamento.

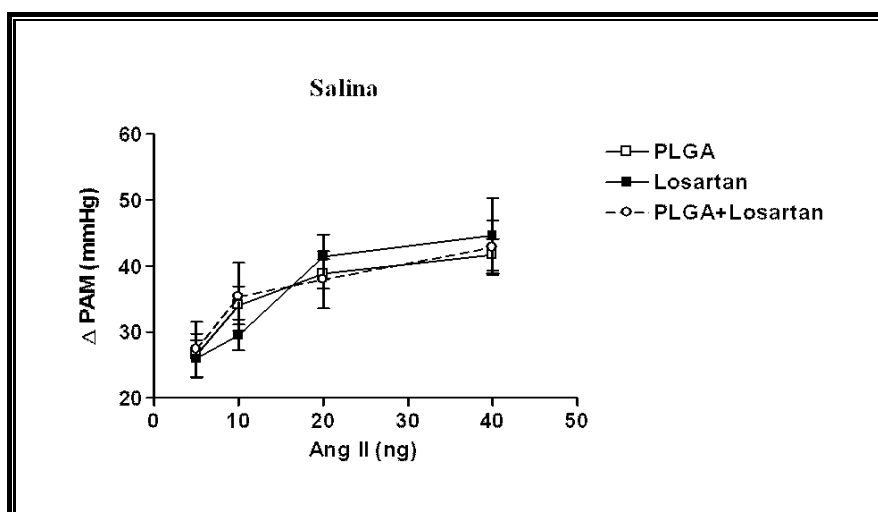
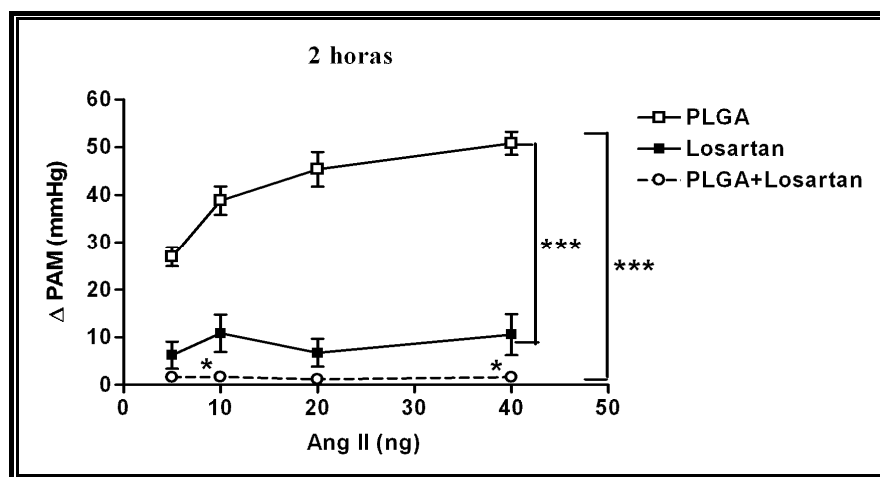


FIGURA 9 - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar após injeção de suspensão de microesferas de PLGA/Losartan em salina por via subcutânea. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Os resultados obtidos nos experimentos realizados em animais normotensos tratados por 48 horas com a formulação PLGA/Losartan sob a forma de suspensão estão ilustrados nos gráficos das figuras 9 a 15. Verifica-se então que os animais tratados com a formulação PLGA/Losartan apresentaram um bloqueio do efeito pressor da Ang II estatisticamente significativo comparado aos animais tratados apenas com o polímero.

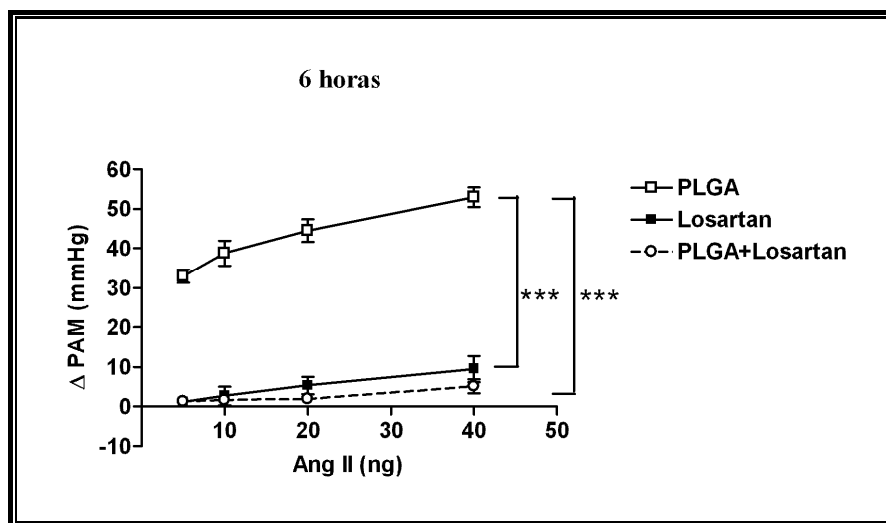
Na figura 10 nota-se que nenhum efeito pressor da Ang II foi detectado 2 horas após a administração da formulação PLGA/Losartan quando comparado ao tratamento apenas com o polímero. O mesmo ocorreu nos animais tratados com Losartan. Nessa mesma figura, comparando-se os dois tipos de tratamento, PLGA/Losartan e Losartan verificam-se ainda que o primeiro foi mais efetivo em relação ao segundo nas doses de 10 e 40 ng de Ang II.



**FIGURA 10** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após duas horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Losartan, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA.

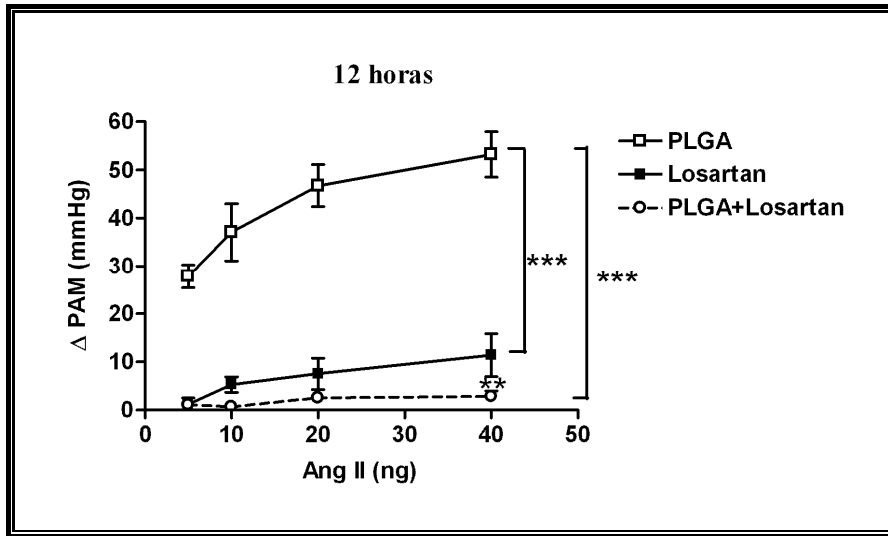
Os gráficos das figuras 10 a 15 apresentam os dados obtidos 2, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a administração da formulação e seus controles. Os resultados apresentados nessas figuras mostram que no grupo de animais tratados com a formulação PLGA/Losartan o bloqueio do efeito pressor da Ang II se manteve ao longo das 48 horas de tratamento. Tal bloqueio foi estatisticamente significativo comparado ao grupo controle PLGA. Outro resultado ilustrado nessas figuras é que o bloqueio do efeito pressor obtido nos animais tratados com Losartan foi significativo durante apenas 24 horas de tratamento comparado ao grupo PLGA.

Comparando-se os resultados obtidos nos animais do grupo Losartan aos animais do grupo PLGA/Losartan observa-se também, que não houve diferenças significativas entre ambos durante as 48 horas de tratamento. Nos animais tratados com PLGA/Losartan após 12 e 24 horas de tratamento, o bloqueio obtido com a dose de 40 ng de Ang II foi significativamente maior que o obtido nos animais do grupo Losartan

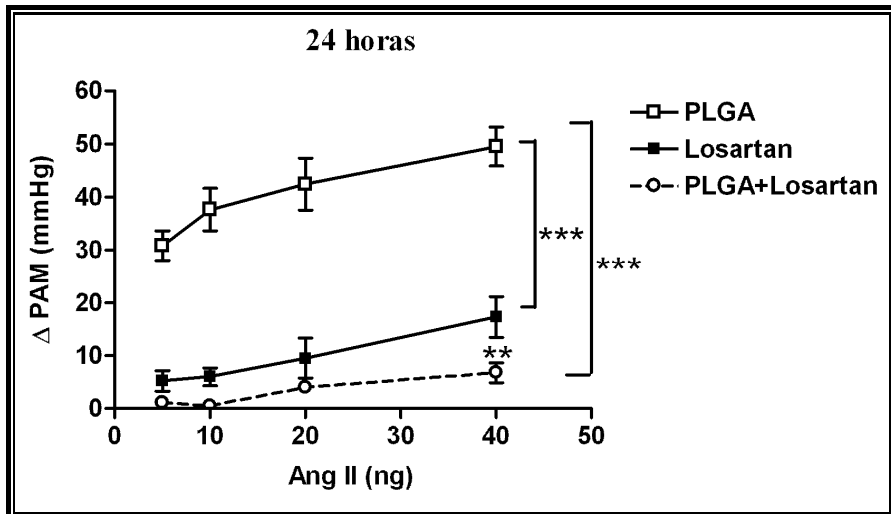


**FIGURA 11** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar normotensos após 6 horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan em salina por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA.

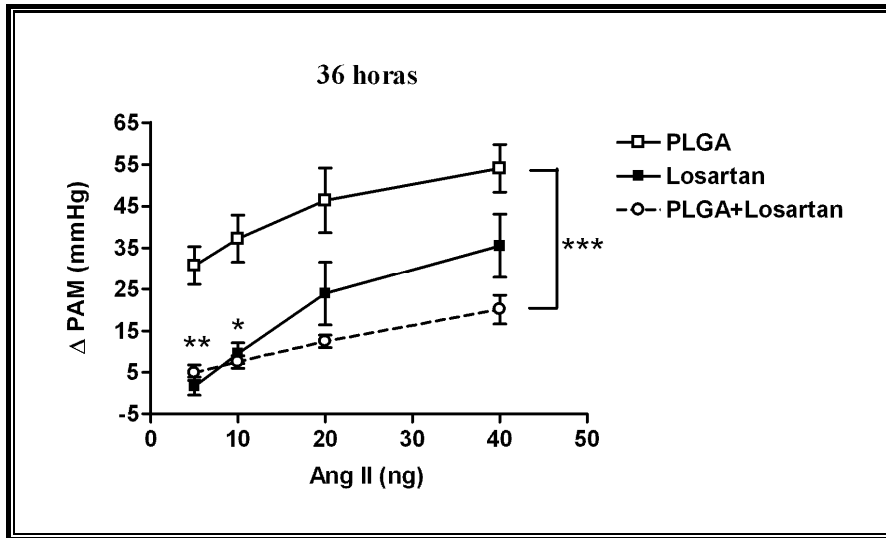




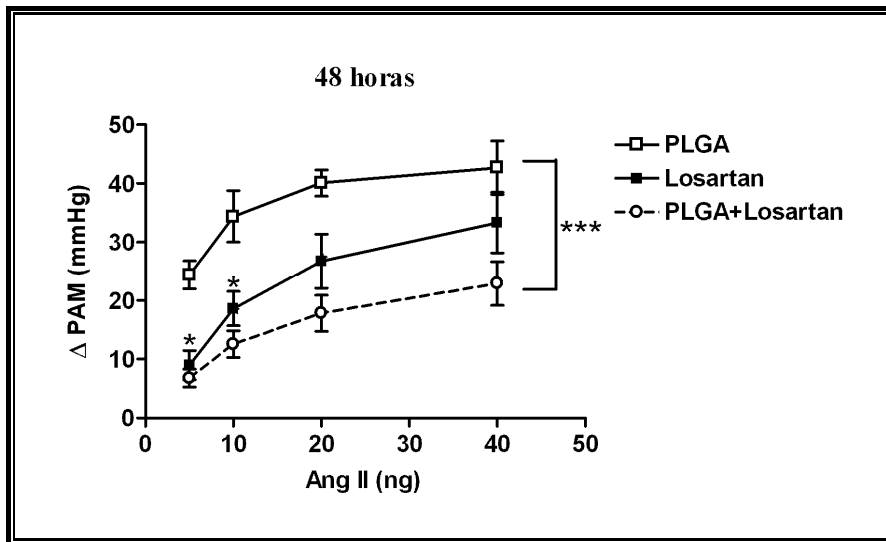
**FIGURA 12** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 12 horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; ■ Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva Losartan, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA.



**FIGURA 13** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 24 horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; ■ Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à curva Losartan, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à curva PLGA.



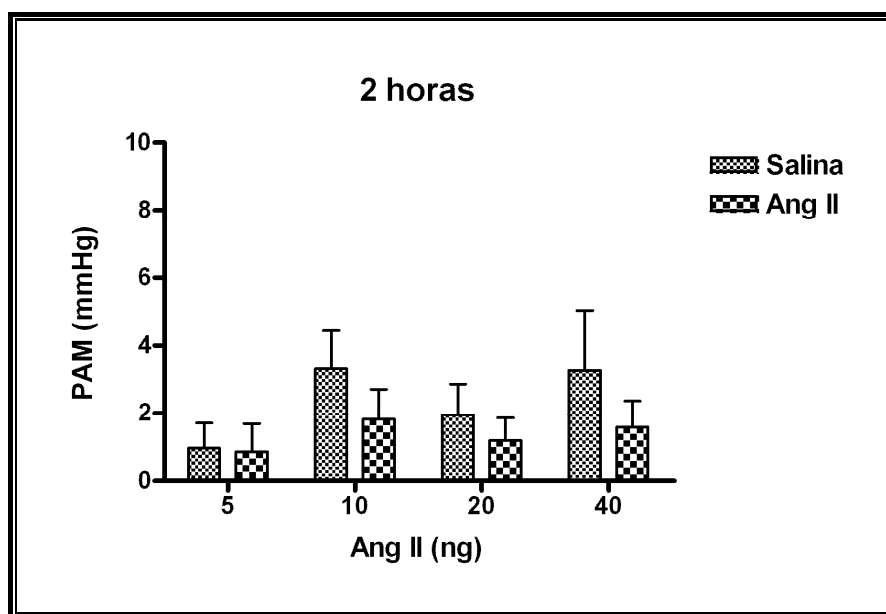
**FIGURA 14** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 36 horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA, n =5; —■—Grupo controle Losartan, n =5; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan, n =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* p < 0,05 comparado à curva PLGA, \*\* p < 0,01 comparado à curva PLGA, \*\*\* p < 0,001 comparado à curva PLGA.



**FIGURA 15** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 48 horas da administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA, n =5; —■—Grupo controle Losartan, n =5; .....○.....Grupo tratado PLGA/Losartan, n =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* p < 0,05 comparado à curva PLGA, \*\*\* p < 0,001 comparado à curva PLGA.

Como controle para as respostas a Ang II, durante a realização de cada curva dose-resposta, salina fisiológica no volume de 0,1 mL era administrada antes de cada dose de Ang II em todos os grupos experimentais.

Os dados da figura 16 mostram que as respostas obtidas com as doses crescentes de Ang II são menores ou equivalentes às obtidas com solução salina fisiológica, porém não foram estatisticamente significativas na curva realizada 2 horas após a administração da formulação PLGA/Losartan. Para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $1,0 \pm 0,7$  vs  $1,3 \pm 1,0$ ;  $3,3 \pm 1,1$  vs  $1,2 \pm 0,8$ ;  $1,5 \pm 1,2$  vs  $0,9 \pm 0,7$ ;  $3,3 \pm 1,8$  vs  $1,2 \pm 0,7$ .



**FIGURA 16** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 2 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

As figuras 17, 18 e 19 apresentam resultados semelhantes aos da figura 16. Na figura 17, para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $2,5 \pm 1,4$  vs  $1,3 \pm$

0,8;  $2,0 \pm 1,0$  vs  $1,6 \pm 1,1$ ;  $0,6 \pm 0,9$  vs  $1,7 \pm 1,0$ ;  $2,6 \pm 1,5$  vs  $4,4 \pm 1,8$ . Na figura 18, para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $1,6 \pm 1,1$  vs  $0,8 \pm 1,4$ ;  $1,3 \pm 0,8$  vs  $0,3 \pm 0,5$ ;  $1,4 \pm 0,8$  vs  $0,8 \pm 1,4$ ;  $2,6 \pm 1,0$  vs  $1,8 \pm 0,7$ . Na figura 19, os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $2,4 \pm 1,5$  vs  $1,9 \pm 1,2$ ;  $3,4 \pm 1,3$  vs  $1,5 \pm 1,1$ ;  $3,4 \pm 1,2$  vs  $3,0 \pm 0,5$ ;  $2,4 \pm 0,6$  vs  $6,2 \pm 1,8$ .

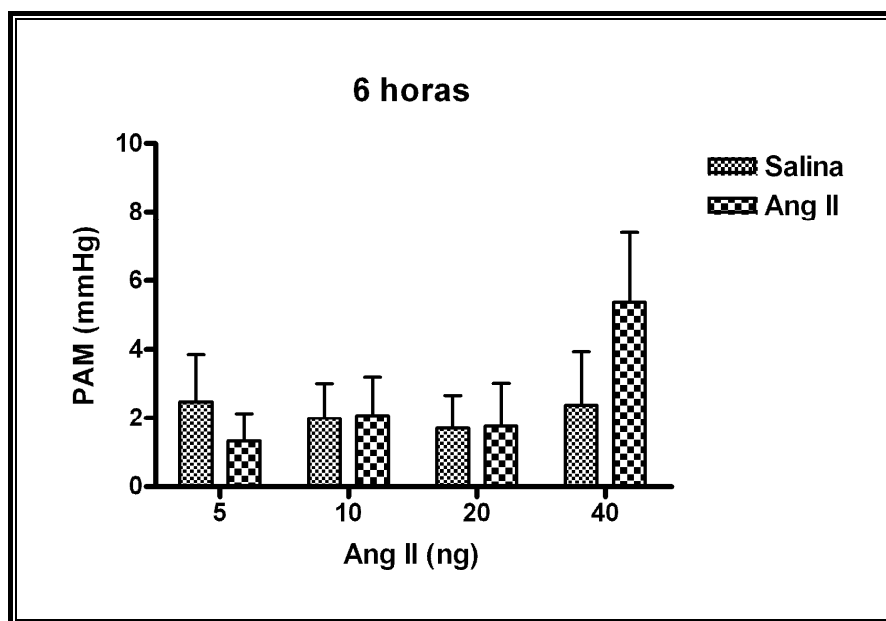
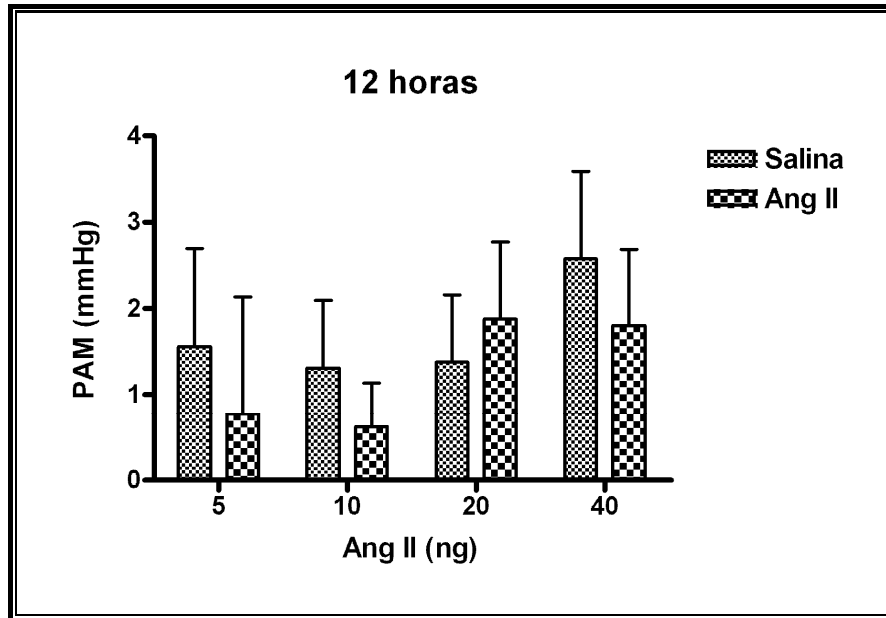


FIGURA 17 - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 6 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Os gráficos das figuras 16 a 19 mostram que durante as primeiras 24 horas de experimento o bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido com a formulação PLGA/Losartan foi completo, pois as respostas pressoras obtidas com as doses crescentes de Ang II foram menores ou equivalentes àsquelas obtidas com a salina fisiológica. Os dados apresentados na figura 20 mostram que a partir da trigésima sexta hora as respostas pressoras obtidas com a Ang II foram maiores que as com solução

salina, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $3,5 \pm 3,5$  vs  $3,7 \pm 1,8$ ;  $-0,3 \pm 1,6$  vs  $7,5 \pm 1,5$ ;  $4,0 \pm 2,0$  vs  $12,4 \pm 1,5$ ;  $3,0 \pm 3,7$  vs  $20,2 \pm 4,8$ .



**FIGURA 18** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 12 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

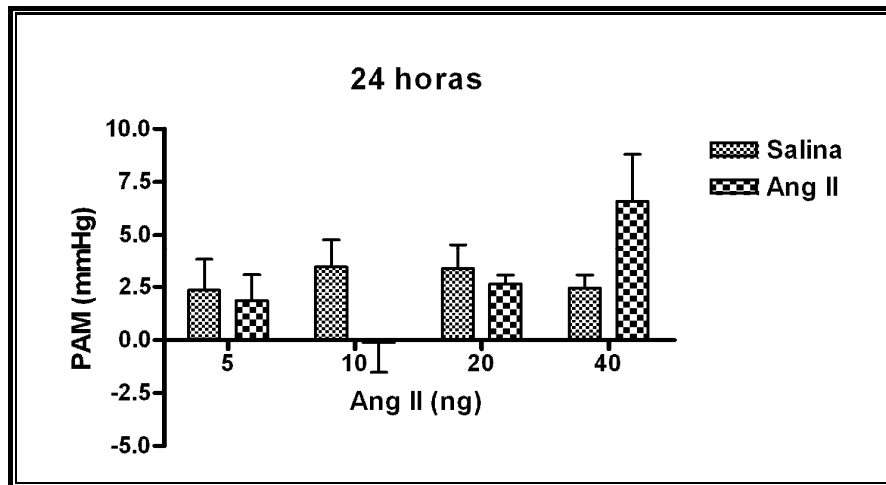


FIGURA 19 - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 24 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

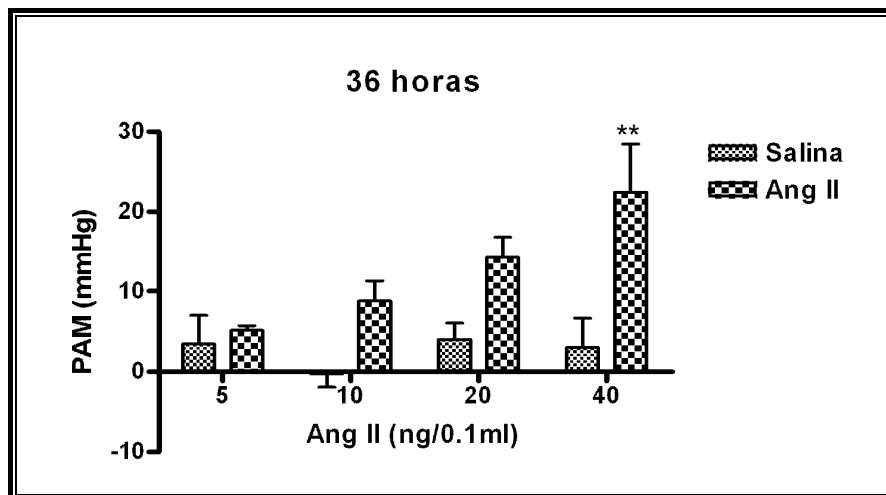
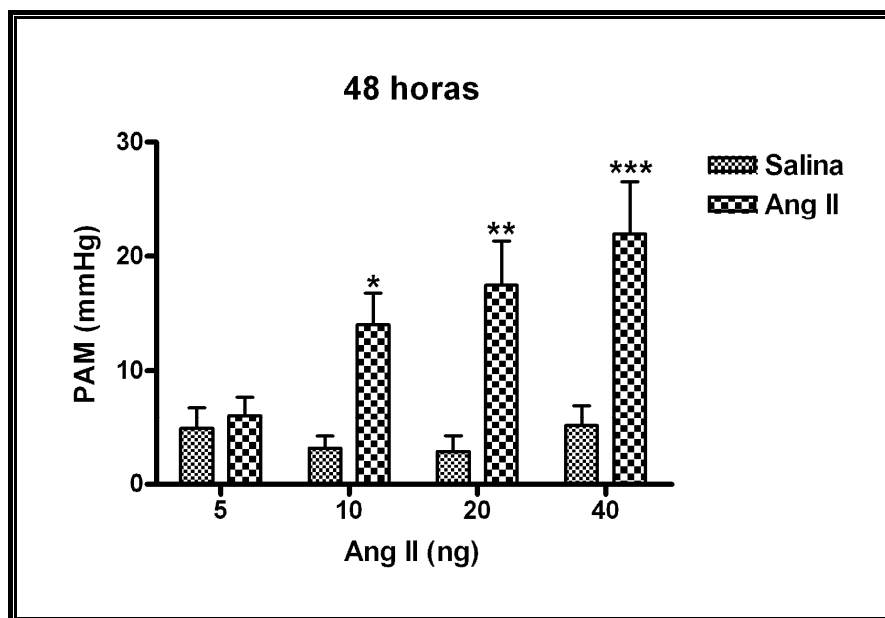


FIGURA 20 - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 36 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Na figura 21 observamos que a partir da quadragésima oitava hora as respostas pressoras obtidas com a Ang II foram significativamente maiores que as obtidas com solução salina.

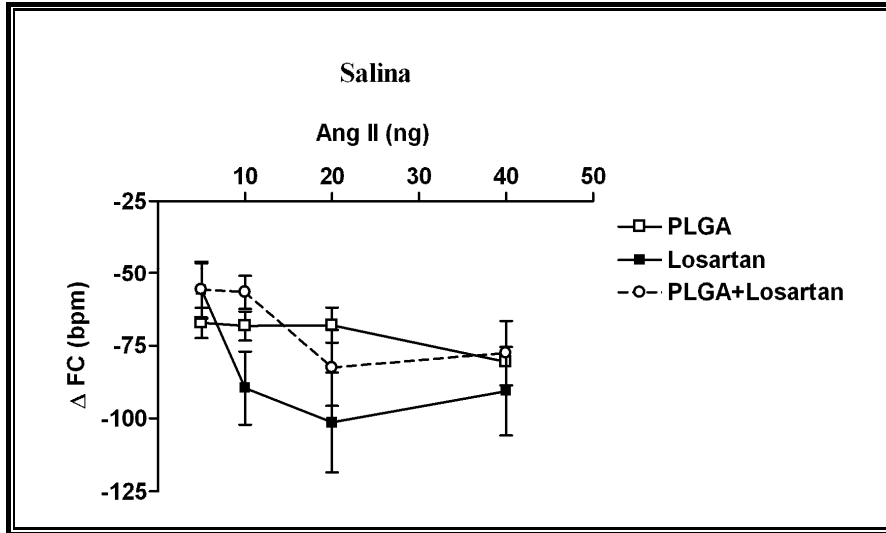


**FIGURA 21** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 48 horas após administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado à dose 10ng/0.1ml, \*\*  $p < 0,01$  comparado a dose 20ng/0.1ml, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à dose 40ng/0.1ml.

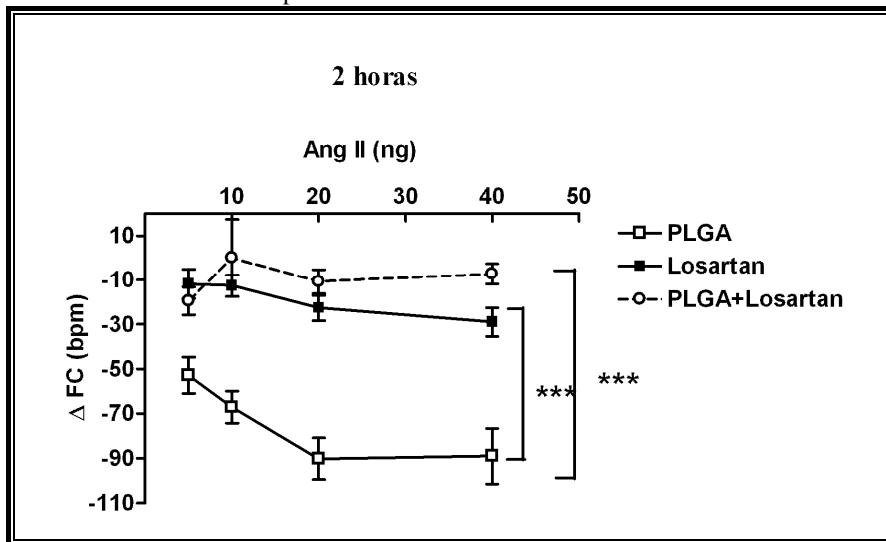
Os resultados obtidos para a frequência cardíaca nesses experimentos estão de acordo com os obtidos para a PAM. A administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan bloqueou significativamente o efeito pressor da Ang II ao final de 48 horas quando comparado aos grupos controles PLGA e Losartan. Na ausência do efeito pressor causado pela Ang II, verifica-se também a ausência de bradicardia reflexa nos animais tratados com a formulação PLGA/Losartan quando comparados aos animais controles. Essa ausência pode ser observada durante as primeiras 24 horas de experimento (figuras 23 a 26).

Nos animais tratados com Losartan, a frequência cardíaca se comportou da mesma forma que nos animais tratados com PLGA/Losartan (figuras 22 a 28).

No caso dos animais tratados apenas com o polímero, os dados das figuras 22 a 28 mostram que durante todo o período de tratamento, ou seja, 48 horas, ocorreu uma bradicardia reflexa em decorrência ao efeito pressor causado pelas doses crescentes de Ang II nesses animais.

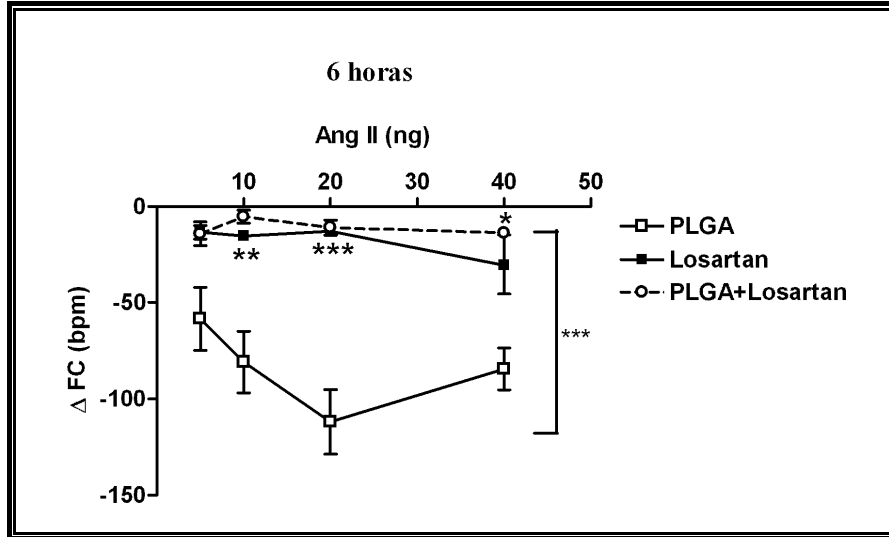


**FIGURA 22** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após injeção de salina por via subcutânea. —□— Grupo controle PLGA, *n* =5; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan, *n* =7. Os dados são apresentados como média ± EPM.

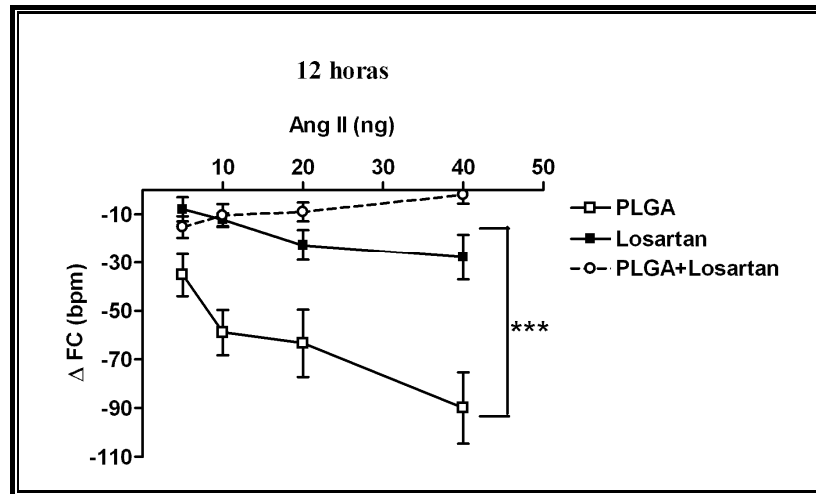


**FIGURA 23** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 2 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA, *n* =5; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan, *n* =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado à curva PLGA.

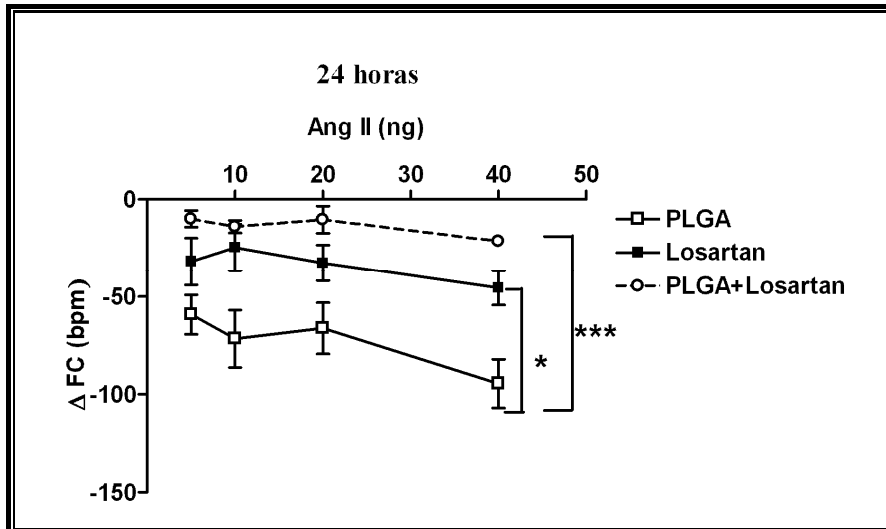




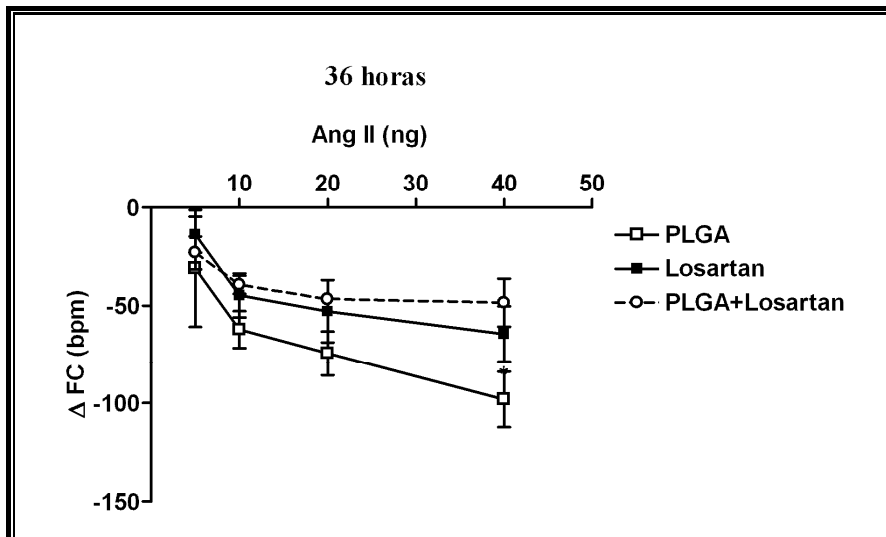
**FIGURA 24** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 6 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA, n =5; ■ Grupo controle Losartan, n =5; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan, n =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* p < 0,05 comparado ao grupo PLGA, \*\* p < 0,01 comparado ao grupo PLGA, \*\*\* p < 0,001 comparado ao grupo PLGA.



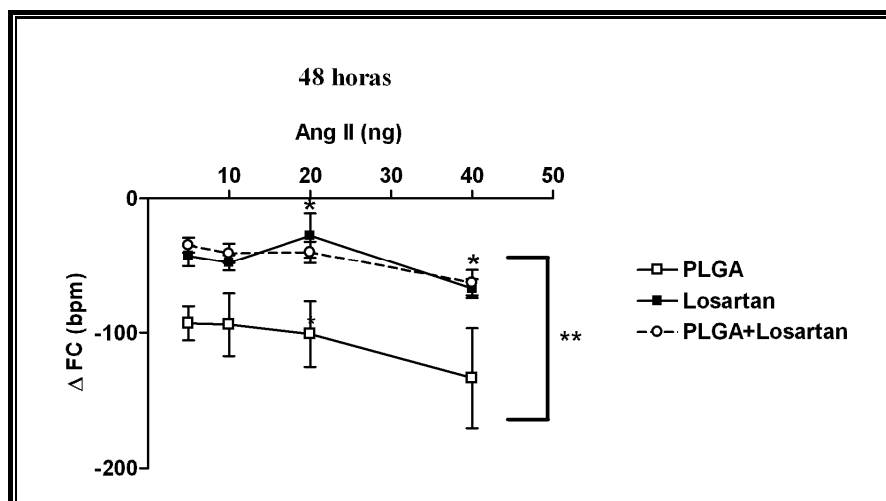
**FIGURA 25** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 12 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA, n =5; ■ Grupo controle Losartan, n =5; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan, n =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* p < 0,001 comparado ao grupo PLGA.



**FIGURA 26** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 24 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA, *n* =5; ■ Grupo controle Losartan, *n* =5; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan, *n* =7. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* *p* < 0,05 comparado ao grupo PLGA, \*\*\* *p* < 0,001 comparado ao grupo PLGA.



**FIGURA 27** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 36 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. □ Grupo controle PLGA, *n* =5; ■ Grupo controle Losartan, *n* =5; ○ Grupo tratado PLGA/Losartan, *n* =7. Os dados são apresentados como média ± EPM.

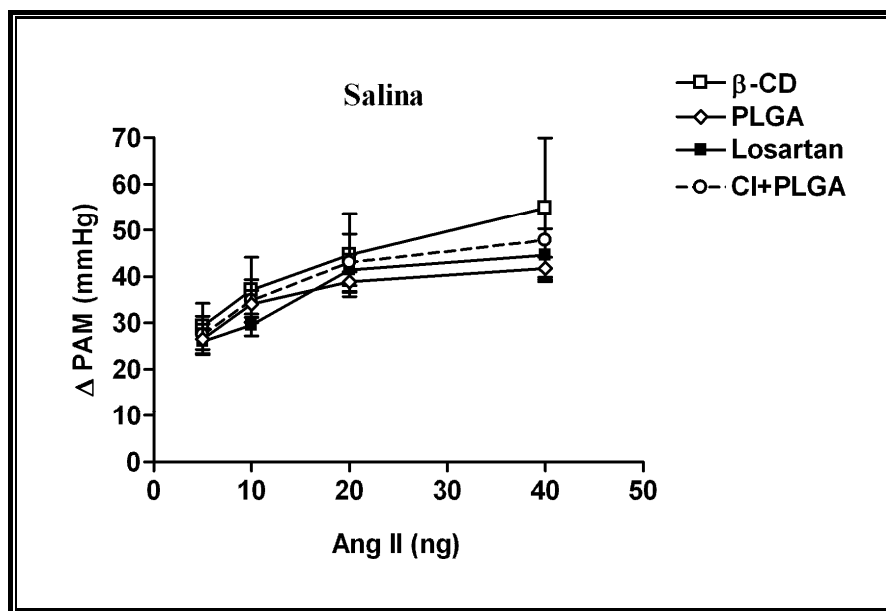


**FIGURA 28** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 48 horas após a administração da suspensão de microesferas de PLGA/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 7$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo PLGA, \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo PLGA.

#### 4.2.2 - SUSPENSÃO DA FORMULAÇÃO CI/PLGA.

A curva concentração-resposta para doses crescentes de Ang II (5, 10, 20, 40 ng i.v.) realizada antes da administração do Losartan (3,0 mg/kg) está representada na figura 29 e mostra que não houve diferenças significativas entre os grupos estudados antes do início do tratamento.

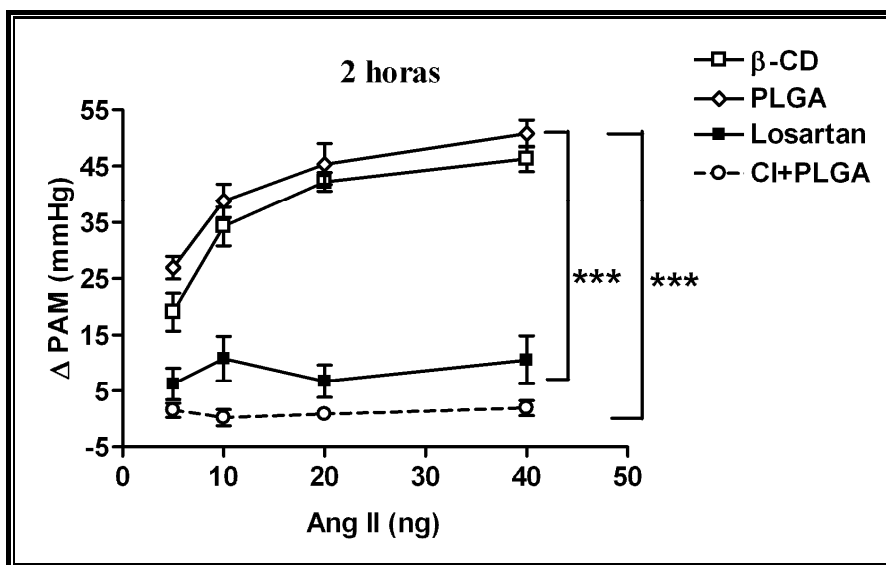
Os resultados obtidos nos experimentos realizados em animais normotensos tratados por 48 horas com a formulação CI/PLGA sob a forma de suspensão estão ilustrados nos gráficos das figuras 29 a 48. Nestas figuras verifica-se que os animais tratados com a formulação CI/PLGA tiveram um bloqueio significativo do efeito pressor da Ang II comparado aos animais tratados apenas com o polímero ou com a  $\beta$ -CD. Os gráficos das figuras 30 a 35 mostram que este bloqueio foi mantido durante as 48 horas de experimento.



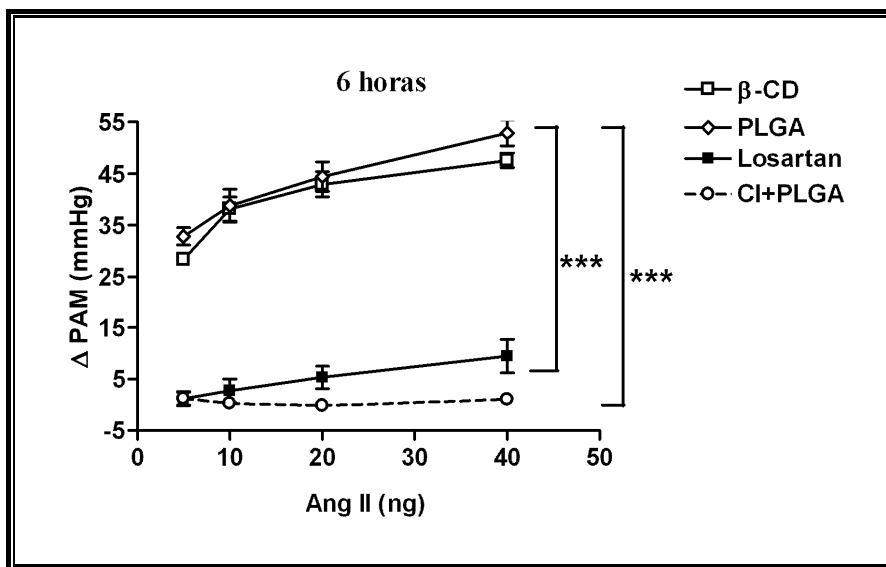
**FIGURA 29** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após injeção de salina por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA,  $n=5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n=4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n=5$ ; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA,  $n=4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Na figura 30 nota-se que nenhum efeito pressor da Ang II foi detectado 2 horas após a administração da formulação CI/PLGA quando comparado ao tratamento apenas com o polímero. O mesmo ocorreu nos animais tratados com Losartan. Nesta mesma figura, comparando-se os dois tipos de tratamento CI/PLGA e Losartan verifica-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre eles, o que pôde ser verificado durante todo o período de tratamento.

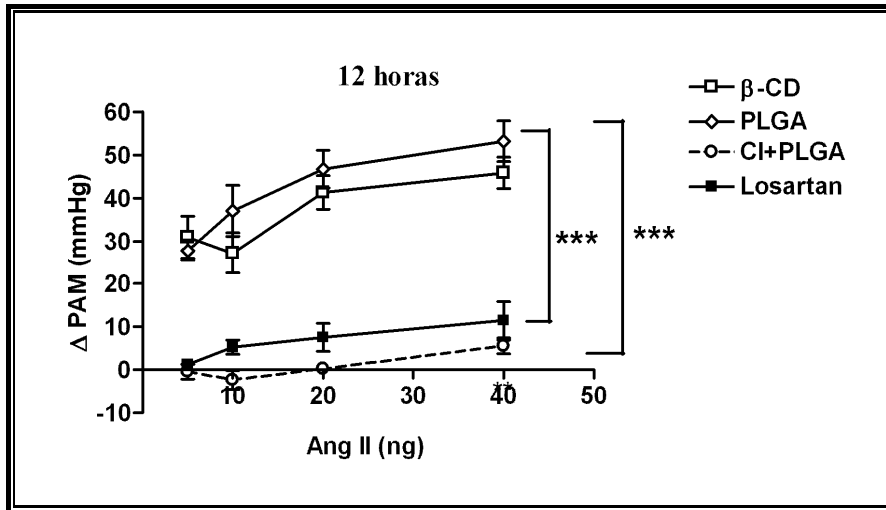
Outro resultado ilustrado nestas figuras é que o bloqueio do efeito pressor obtido nos animais tratados apenas com Losartan foi significativo durante 36 horas de tratamento comparado ao grupo PLGA (figura 34).



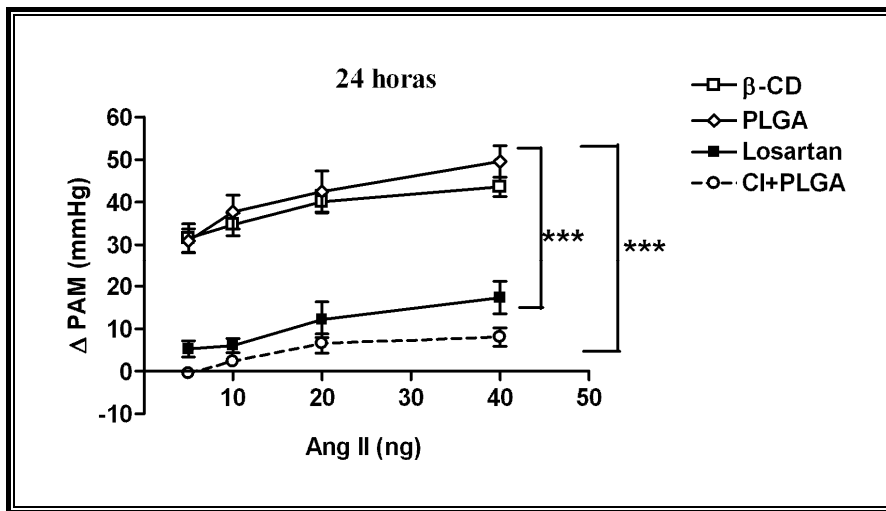
**FIGURA 30** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 2 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.



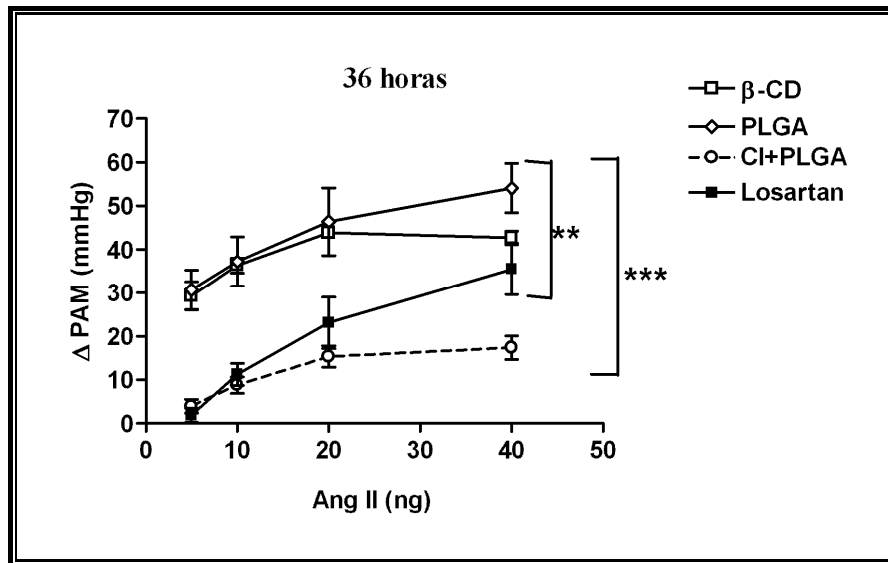
**FIGURA 31** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 6 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.



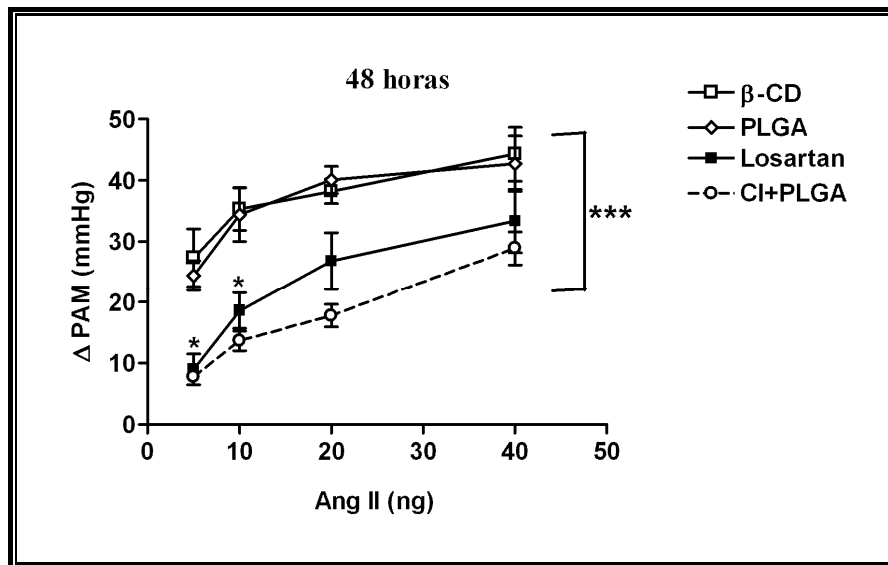
**FIGURA 32** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 12 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.



**FIGURA 33** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 24 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.



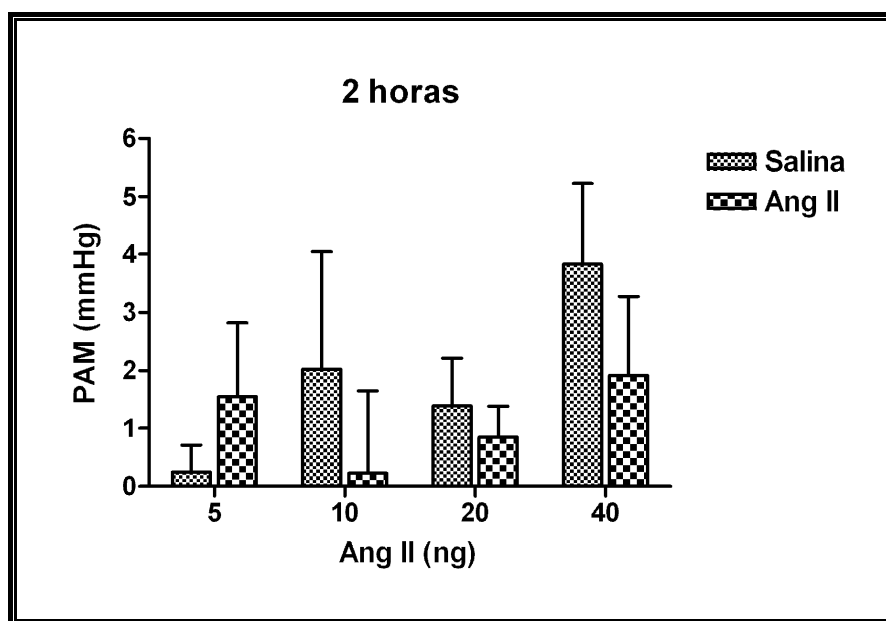
**FIGURA 34** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 36 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, n =5; —□— Grupo controle β-CD, n =4; —■— Grupo controle Losartan, n =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, n =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* p < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.



**FIGURA 35** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 48 horas da administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, n =5; —□— Grupo controle β-CD, n =4; —■— Grupo controle Losartan, n =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, n =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \* p < 0,05 comparado às curvas β-CD e PLGA, \*\*\* p < 0,001 comparado às curvas PLGA e β-CD.

Como controle para as respostas a Ang II, durante a realização de cada curva dose-resposta, salina fisiológica no volume de 0,1 mL era administrada antes de cada dose de Ang II em todos os grupos experimentais.

Os dados da figura 36 mostram que 2 horas após a administração da formulação CI/PLGA, as respostas pressoras obtidas com as doses crescentes de Ang II são menores ou equivalentes às obtidas com salina fisiológica, porém, não foram estatisticamente significativas na curva realizada. Para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $0,3 \pm 0,5$  vs  $1,6 \pm 1,3$ ;  $2,7 \pm 1,5$  vs  $0,2 \pm 1,4$ ;  $1,4 \pm 0,8$  vs  $0,9 \pm 0,5$ ;  $3,8 \pm 1,4$  vs  $1,9 \pm 1,4$ .

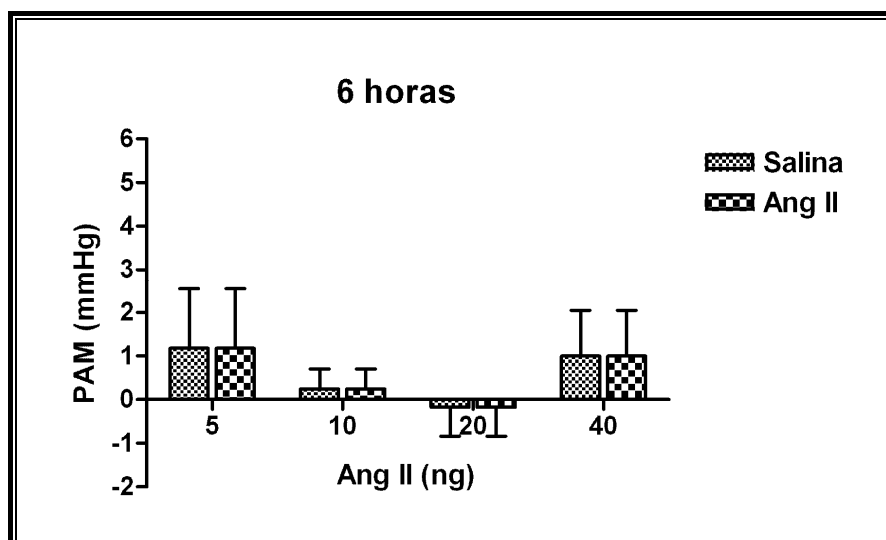


**FIGURA 36** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 2 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

As figuras 37, 38 e 39 apresentam resultados semelhantes aos da figura 36. Na figura 37, para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $1,3 \pm 0,7$  vs  $1,2 \pm$



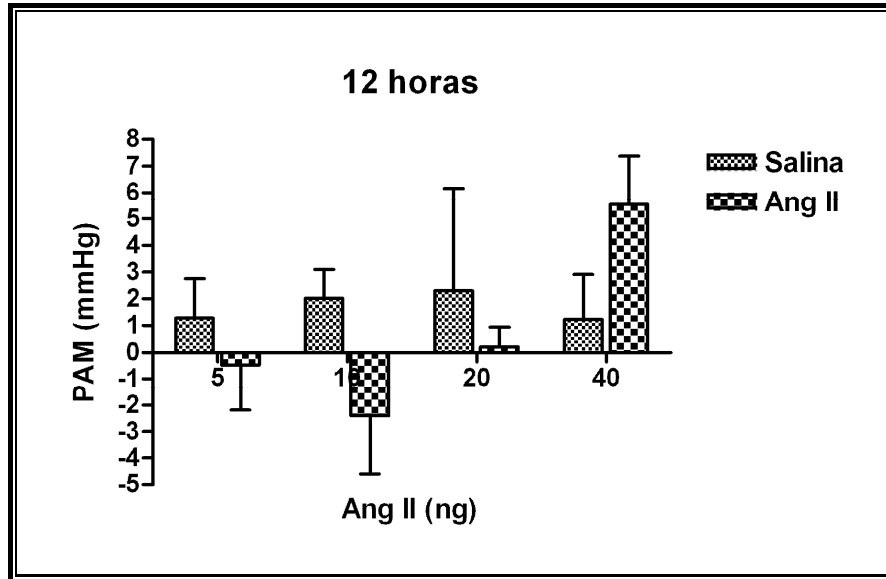
1,4;  $2,4 \pm 1,5$  vs  $0,3 \pm 0,5$ ;  $2,4 \pm 0,9$  vs  $-0,2 \pm 0,7$ ;  $1,3 \pm 1,0$  vs  $1,0 \pm 1,1$ . Na figura 38, para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $1,3 \pm 1,5$  vs  $-0,5 \pm 1,7$ ;  $2,0 \pm 1,1$  vs  $-2,4 \pm 2,2$ ;  $2,3 \pm 3,9$  vs  $0,2 \pm 0,7$ ;  $1,2 \pm 1,7$  vs  $5,6 \pm 1,8$ . Na figura 39, para as doses de 5, 10, 20 e 40 ng os valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente para salina e Ang II:  $3,7 \pm 1,2$  vs  $-0,5 \pm 0,8$ ;  $3,5 \pm 1,2$  vs  $2,3 \pm 1,0$ ;  $3,6 \pm 0,6$  vs  $6,5 \pm 2,3$ ;  $5,9 \pm 2,7$  vs  $8,0 \pm 2,2$ .



**FIGURA 37** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 6 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Os gráficos das figuras 36 a 39 mostram que durante as primeiras 24 horas de experimento o bloqueio do efeito pressor da Ang II obtido com a formulação CI/PLGA foi um bloqueio completo devido às respostas pressoras obtidas com as doses crescentes de Ang II terem sido menores ou equivalentes àsquelas obtidas com a salina fisiológica. Os dados apresentados na figura 40 mostram que a partir da trigésima sexta hora as respostas pressoras obtidas com a Ang II foram maiores que as com salina, porém essa diferença só foi estatisticamente significativa para as doses de 20 e 40 ng de Ang II. Os

valores médios da pressão arterial média, em milímetros de mercúrio, são respectivamente, para salina e Ang II:  $1,1 \pm 0,8$  vs  $4,0 \pm 1,6$ ;  $2,4 \pm 0,3$  vs  $8,8 \pm 1,9$ ;  $2,7 \pm 3,1$  vs  $15,3 \pm 2,5$ ;  $4,3 \pm 1,6$  vs  $17,4 \pm 2,8$ .



**FIGURA 38** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 12 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

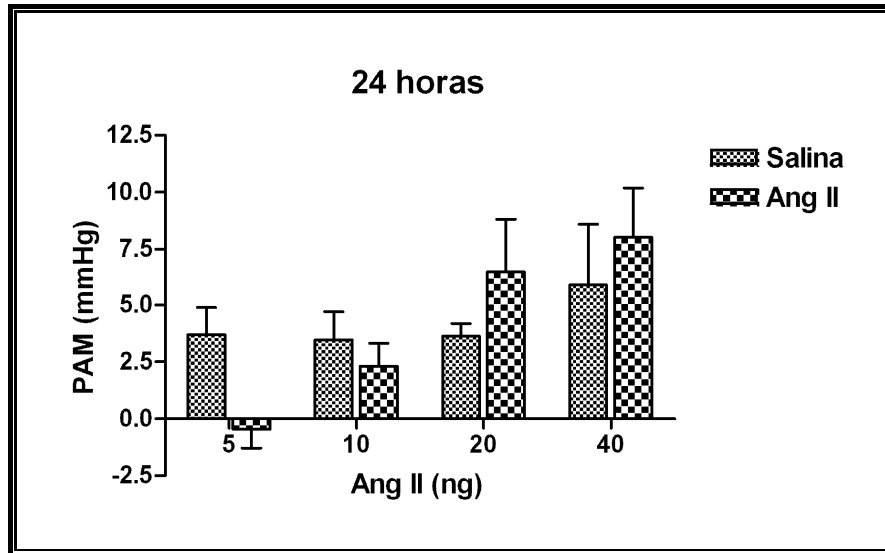


FIGURA 39 - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 24 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

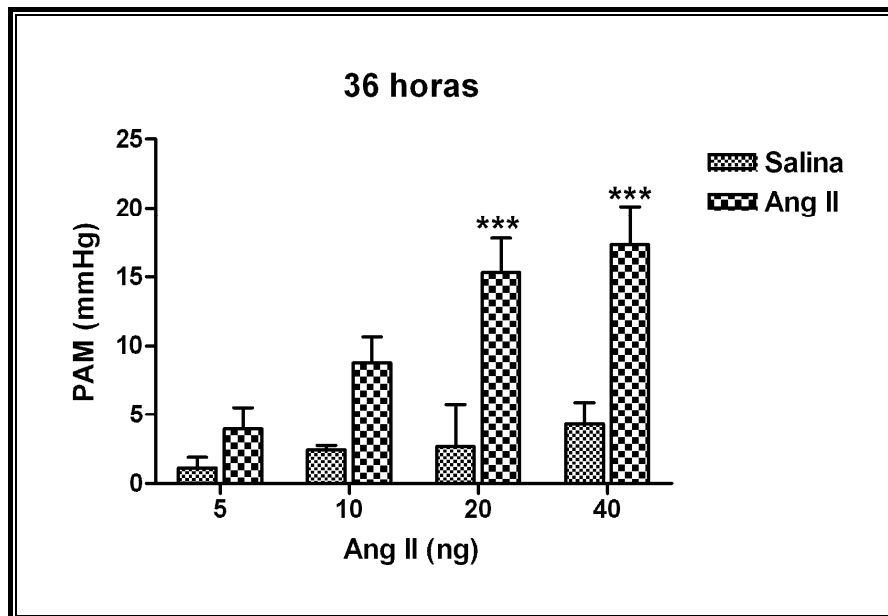
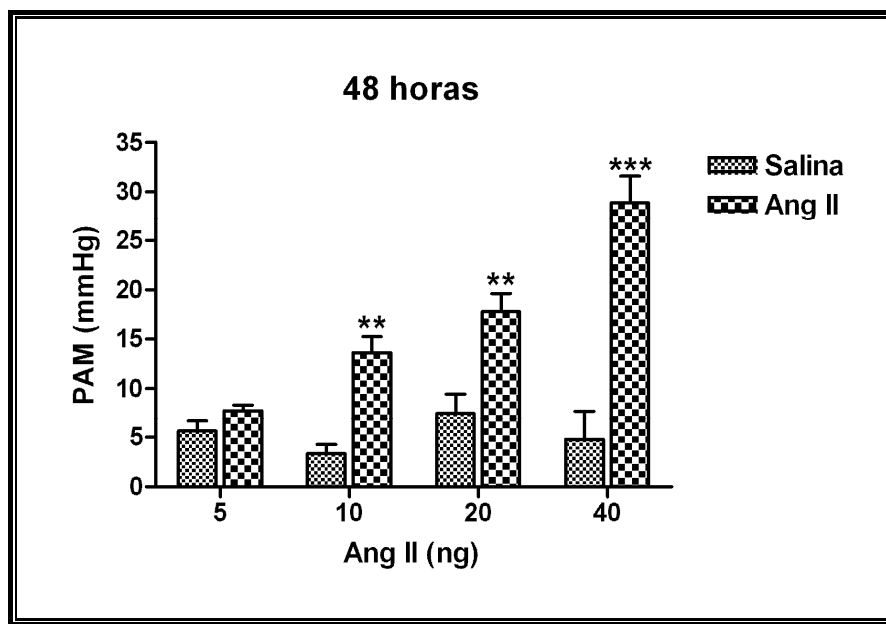


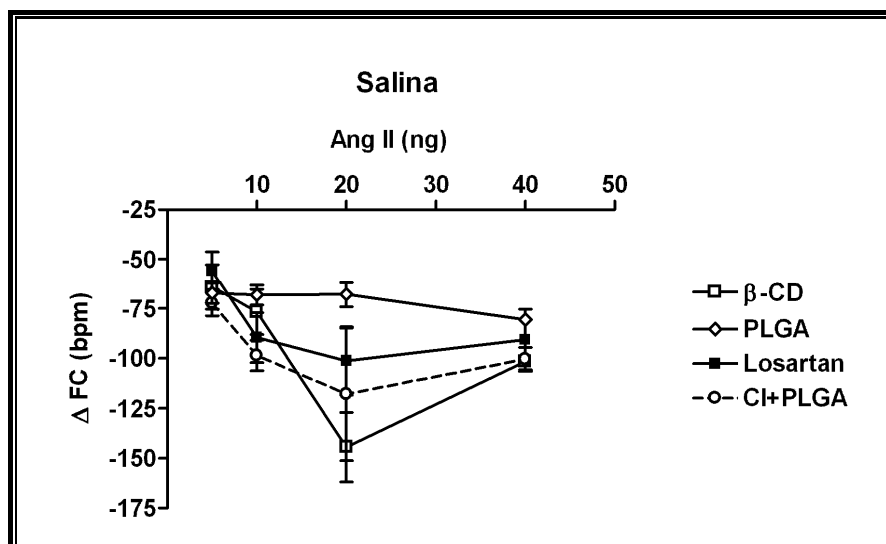
FIGURA 40 - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 36 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à salina.



**FIGURA 41** - Comparação entre as respostas pressoras obtidas após injeção intravenosa de salina e Ang II em suas respectivas doses durante o teste o bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos, 48 horas após administração da suspensão de microesferas de CI/PLGA por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  comparado à salina, \*\*\*  $p < 0,001$  comparado à salina.

Os gráficos das figuras 42 a 48 mostram os dados de frequência cardíaca obtidos quando a suspensão do CI/PLGA foi administrada por via subcutânea no lugar da associação da droga com o polímero.

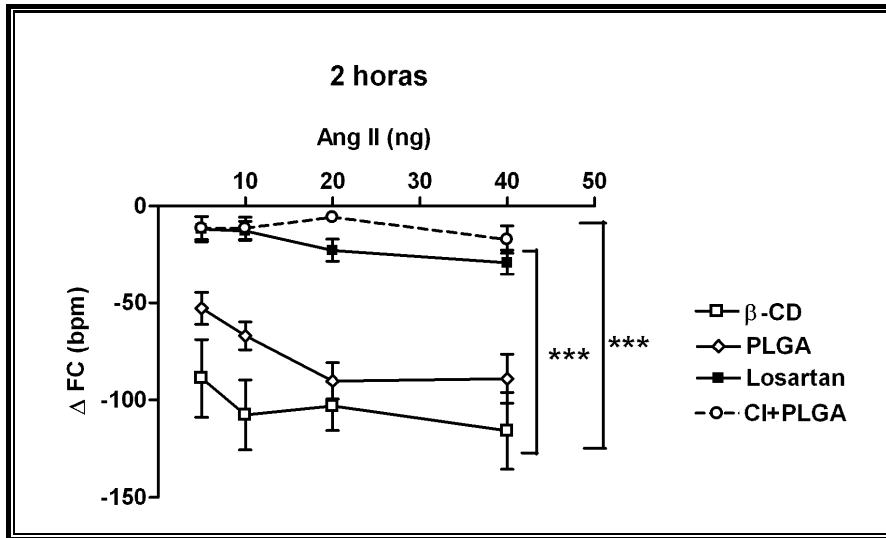
Semelhantemente aos resultados para a frequência cardíaca obtidos com a formulação PLGA/Losartan, os resultados obtidos com CI/PLGA também estão de acordo com os obtidos para a PAM nesses experimentos. A administração da suspensão de CI/PLGA bloqueou significativamente o efeito pressor da Ang II ao final de 48 horas quando comparado aos grupos controles PLGA e Losartan. Na ausência do efeito pressor causado pela Ang II, verifica-se também a ausência de bradicardia reflexa nos animais tratados com a formulação CI/PLGA quando comparados aos animais controles. Essa ausência pode ser observada durante 24 horas de experimento (figuras 27 a 30).



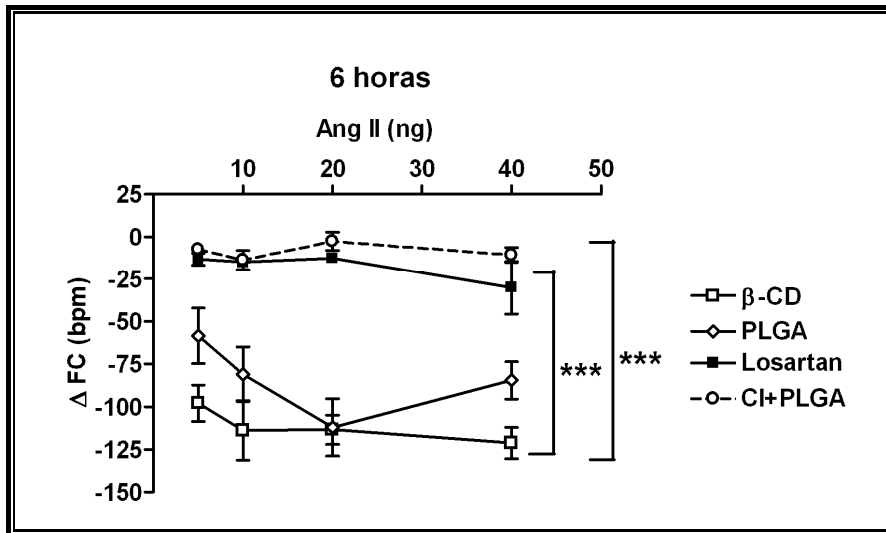
**FIGURA 42** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após injeção de salina por via subcutânea. —◇— Grupo controle PLGA,  $n = 5$ ; —□— Grupo controle  $\beta$ -CD,  $n = 4$ ; —■— Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Nos animais tratados com Losartan, a frequência cardíaca se comportou da mesma forma que nos animais tratados com CI/Losartan (figuras 43 a 46).

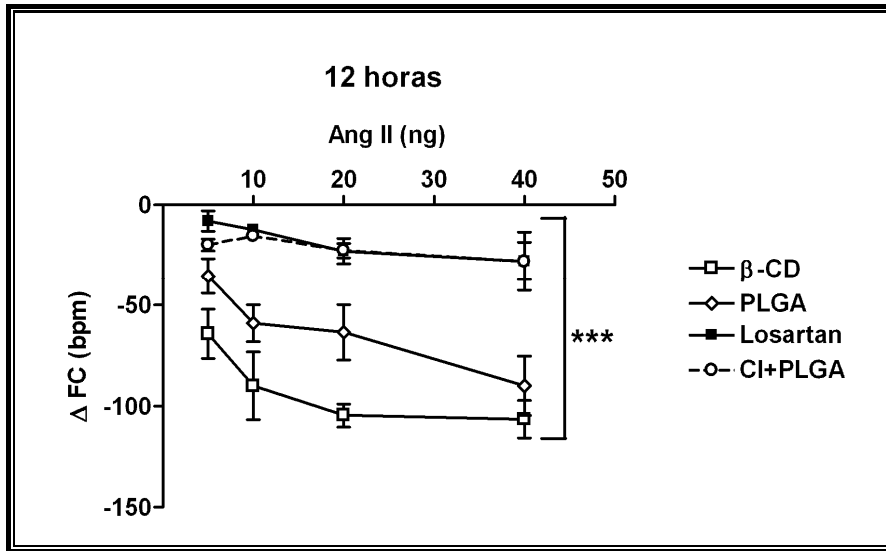
No caso dos animais tratados apenas com o polímero, os dados das figuras 43 a 48 mostram que durante todo o período de tratamento, ou seja, 48 horas, ocorreu uma bradicardia reflexa em decorrência ao efeito pressor causado pelas doses crescentes de Ang II nesses animais.



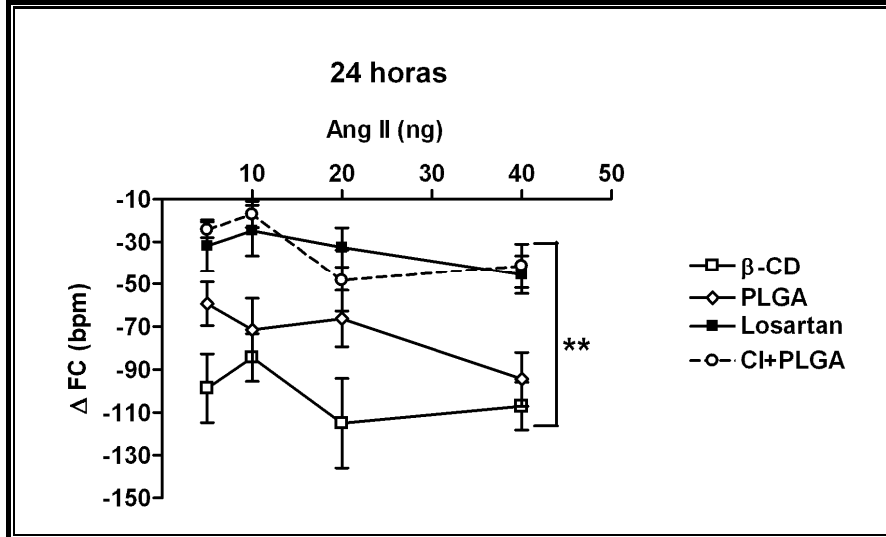
**FIGURA 43** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 2 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado à curva PLGA.



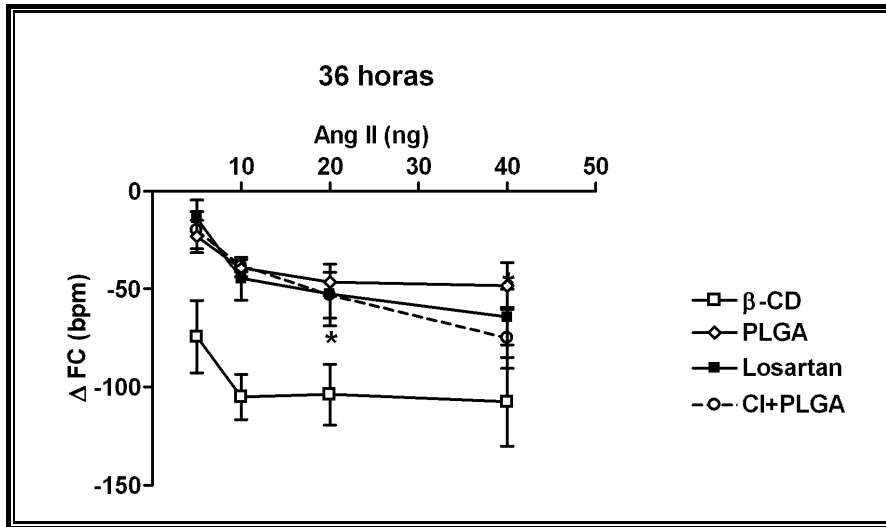
**FIGURA 44** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 6 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado à curva PLGA.



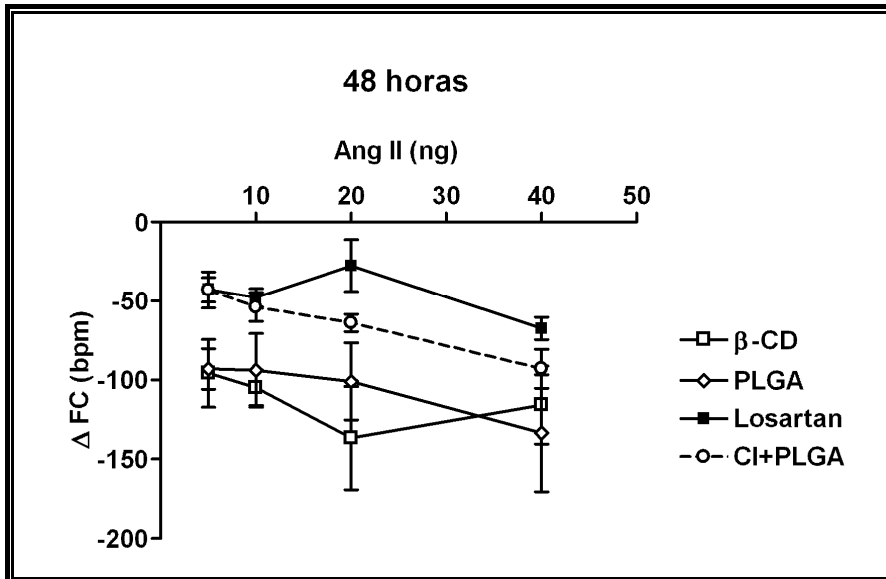
**FIGURA 45** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 12 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\*\* *p* < 0,001 comparado à curva PLGA.



**FIGURA 46** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 24 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM. \*\* *p* < 0,01 comparado à curva PLGA.



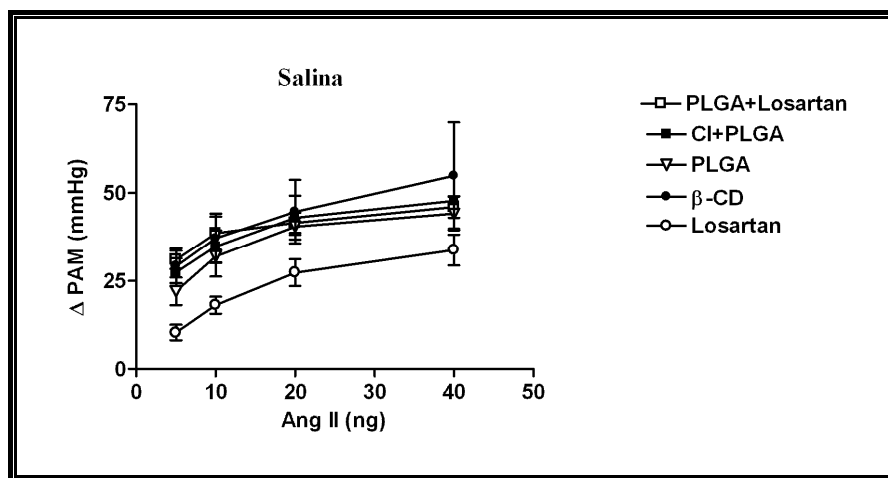
**FIGURA 47** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 36 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM.



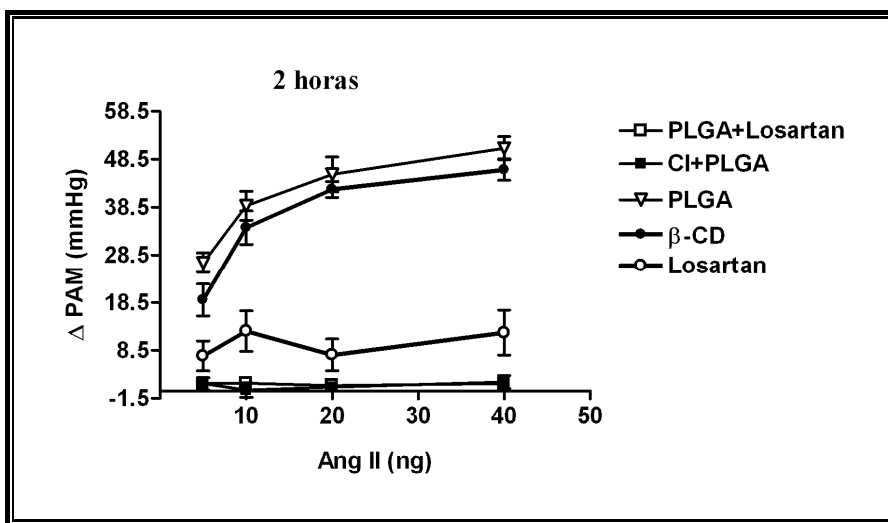
**FIGURA 48** - Alterações da FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 48 horas após a administração da suspensão de microesferas de CI/Losartan por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —◇— Grupo controle PLGA, *n* =5; —□— Grupo controle β-CD, *n* =4; —■— Grupo controle Losartan, *n* =5; .....○..... Grupo tratado CI/PLGA, *n* =4. Os dados são apresentados como média ± EPM.



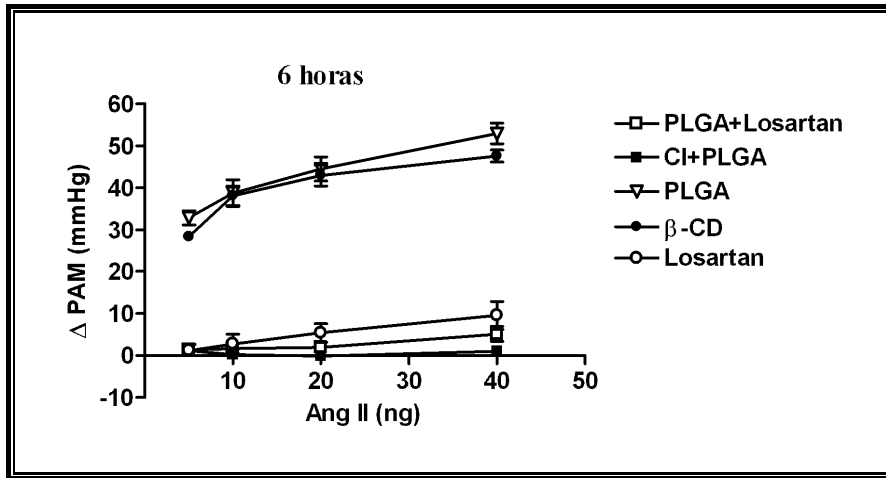
Quando comparadas, os dois diferentes tipos de formulação se mostraram equivalentes em bloquear o efeito pressor da Angiotensina II, visto que não houve diferenças significativas entre esses dois tipos como observado nos gráficos das figuras 50 a 55.



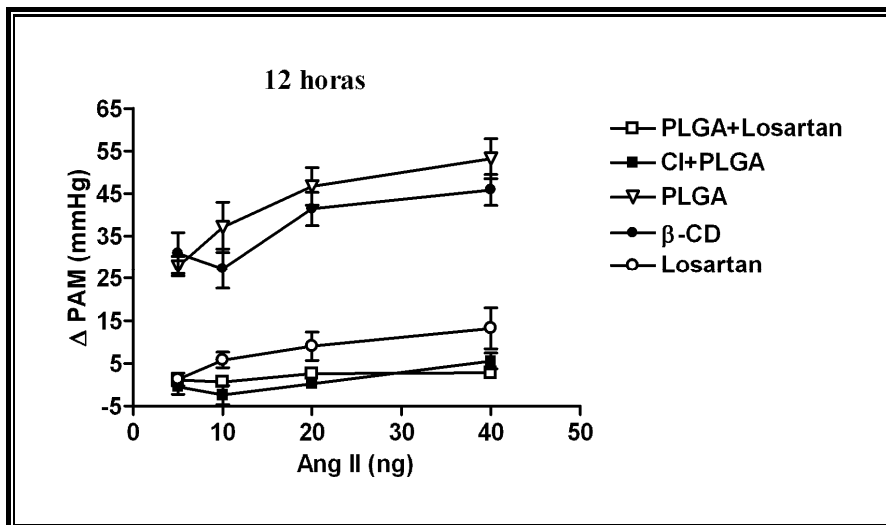
**FIGURA 49** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após injeção de salina por via subcutânea. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ ; —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo β-CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



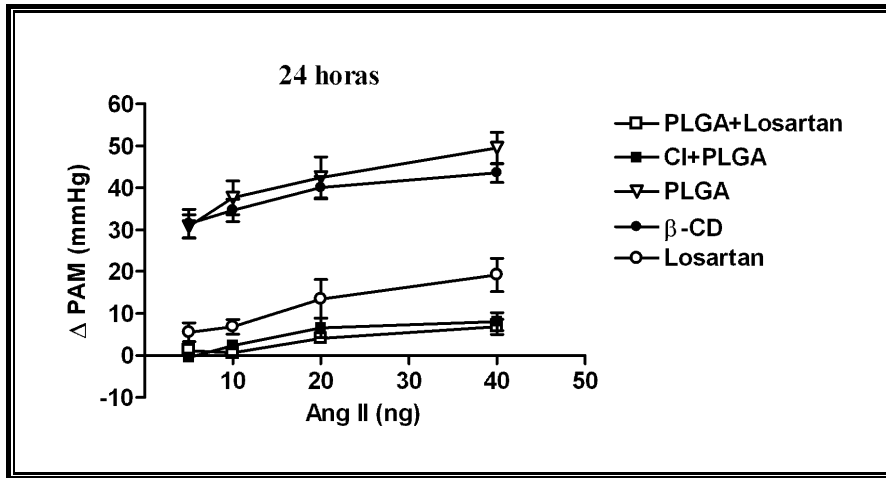
**FIGURA 50** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 2 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ ; —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo β-CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



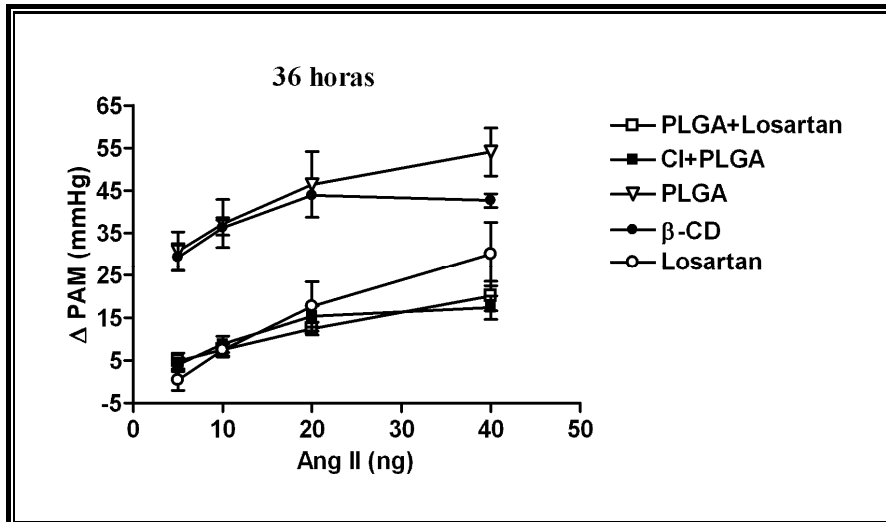
**FIGURA 51** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 6 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



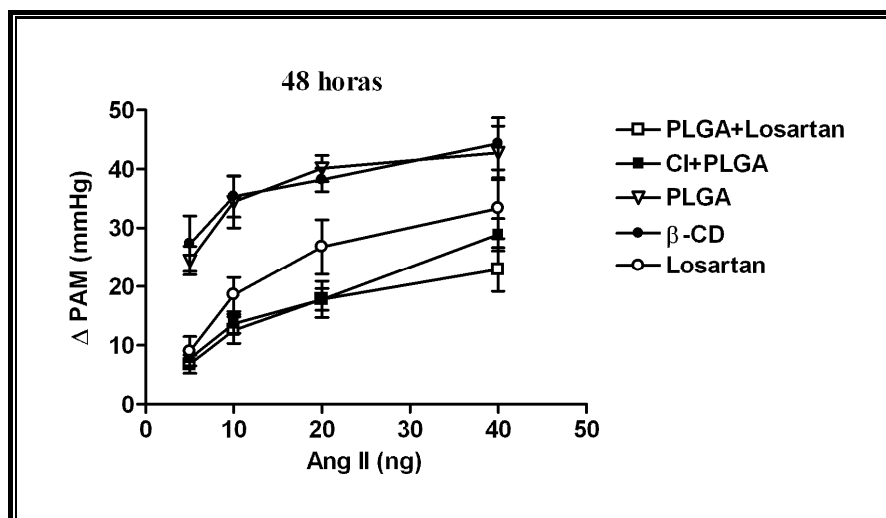
**FIGURA 52** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 12 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ , —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$ , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**FIGURA 53** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 24 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan, *n* =7; —■—Grupo CI/PLGA, *n* =4; —○—Grupo Losartan, *n* =5, —▽—Grupo PLGA, *n* =5 , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA, *n* =4 . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**FIGURA 54** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 36 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan, *n* =7; —■—Grupo CI/PLGA, *n* =4; —○—Grupo Losartan, *n* =5, —▽—Grupo PLGA, *n* =5 , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA, *n* =4 . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**FIGURA 55** - Alterações da PAM obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos 48 horas após injeção de CI/PLGA ou PLGA/Losartan. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. —□—Grupo PLGA/Losartan,  $n = 7$ ; —■—Grupo CI/PLGA,  $n = 4$ ; —○—Grupo Losartan,  $n = 5$ ; —▽—Grupo PLGA,  $n = 5$  , —●—Grupo  $\beta$ -CD/PLGA,  $n = 4$  . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### 4.3 - ALTERAÇÕES CRÔNICAS DA PRESSÃO SISTÓLICA DE ANIMAIS NORMOTENSOS DURANTE O TRATAMENTO COM AS PASTILHAS DE PLGA/LOSARTAN OU CI/PLGA ADMINISTRADAS POR VIA SUBCUTÂNEA.

#### 4.3.1 - IMPLANTE DE PASTILHAS DE PLGA/LOSARTAN

Os valores médios de pressão sistólica obtidos no período pré-tratamento (seis dias antes do implante do dispositivo ou da injeção subcutânea) e também durante o período de tratamento (oito dias a contar do implante ou injeção) com seus respectivos erros-padrão estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

A Tabela 1 apresenta os valores médios da PS em mmHg de animais Wistar que foram submetidos ao tratamento com dispositivo de liberação controlada na forma de pastilha composta por Losartan nas doses de 0,7 ou 3,0 mg/kg encapsulado em microesferas do polímero PLGA por um período de oito dias. Esses valores mostram que os diferentes tratamentos não causaram alterações estatisticamente significativas ao longo do oito dias para os três grupos estudados.

**TABELA 1**

Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos PLGA ( $n = 7$ ), Losartan ( $n = 6$ ) e PLGA/Losartan ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Tempo (dias)	Grupos experimentais		
	PLGA	Losartan	PLGA/Losartan
-6	137 $\pm$ 9,1	137 $\pm$ 7,0	133 $\pm$ 6,3
-3	150 $\pm$ 7,9	135 $\pm$ 7,3	141 $\pm$ 7,9
0	160 $\pm$ 5,2	144 $\pm$ 5,3	159 $\pm$ 8,5
4	156 $\pm$ 5,8	146 $\pm$ 8,1	151 $\pm$ 10,5
7	142 $\pm$ 5,6	147 $\pm$ 7,1	140 $\pm$ 6,1

Esse mesmo protocolo realizado utilizando-se uma concentração de Losartan quatro vezes maior, 3,0 mg/Kg forneceu resultados similares aos da Tabela 1, ou seja, sem diferenças estatísticas significativas para os três grupos.

**TABELA 2**

Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos PLGA ( $n = 6$ ), Losartan ( $n = 5$ ) e PLGA/Losartan ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Tempo (dias)	Grupos experimentais		
	PLGA	Losartan	PLGA/Losartan
-6	148 $\pm$ 3,7	139 $\pm$ 7,0	135 $\pm$ 8,4
-3	135 $\pm$ 4,8	136 $\pm$ 2,1	142 $\pm$ 5,4
0	164 $\pm$ 6,0	157 $\pm$ 9,8	154 $\pm$ 9,1
4	125 $\pm$ 6,3	128 $\pm$ 10,5	133 $\pm$ 10,7
7	138 $\pm$ 9,5	138 $\pm$ 11,1	130 $\pm$ 9,3

#### 4.3.2 - CI/PLGA

Com o objetivo de avaliar a ação da  $\beta$ -CD associada ao PLGA na eficácia da preparação, experimentos similares aos do Protocolo 1 foram realizados no Protocolo 3. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos nesses experimentos. Como pode ser visto,

também não ocorreu alteração nos valores de PS de animais normotensos tratados por oito dias com a formulação CI/PLGA. O mesmo ocorreu nos grupos controle.

**TABELA 3**

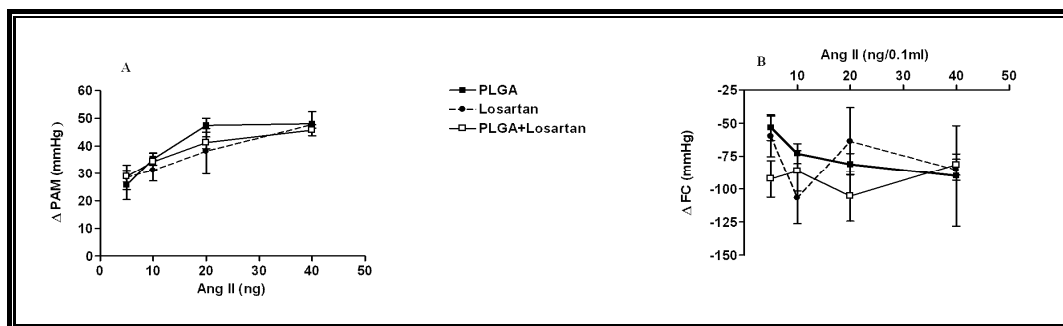
Valores da pressão sistólica (mmHg) de ratos Wistar normotensos obtidos antes e durante o tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha para os grupos  $\beta$ -CD/PLGA ( $n = 4$ ), Losartan ( $n = 6$ ) e CI/PLGA ( $n = 6$ ). Nesse experimento, a concentração usada de Losartan foi de 0,7 mg/Kg. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Grupos experimentais</b>		
	<b><math>\beta</math>-CD</b>	<b>Losartan</b>	<b>CI/PLGA</b>
<b>-6</b>	149 $\pm$ 1,2	137 $\pm$ 7,0	96 $\pm$ 3,7
<b>-3</b>	134 $\pm$ 2,2	135 $\pm$ 7,3	97 $\pm$ 3,8
<b>0</b>	155 $\pm$ 9,9	144 $\pm$ 5,3	97 $\pm$ 4,4
<b>4</b>	154 $\pm$ 4,5	146 $\pm$ 8,1	91 $\pm$ 3,7
<b>7</b>	170 $\pm$ 15,2	147 $\pm$ 7,1	89 $\pm$ 3,5

#### 4.4 - ALTERAÇÕES CRÔNICAS DA PAM E FC OBTIDAS DURANTE O TESTE DO BLOQUEIO DO EFEITO PRESSOR DA ANGIOTENSINA II EM ANIMAIS NORMOTENSOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PLGA/LOSARTAN OU CI/PLGA ADMINISTRADAS POR VIA SUBCUTÂNEA.

##### 4.4.1 - SUSPENSÕES DE MICROESFERAS COMPOSTAS POR PLGA/LOSARTAN

A figura 56 mostra as alterações nos valores da PAM e FC obtidas no teste do bloqueio do efeito pressor da Ang II realizado nos três grupos experimentais ao final de 8 dias de tratamento com o Losartan encapsulado ou não na base PLGA. Diferentemente dos experimentos anteriores, nesses experimentos foram utilizadas suspensões de microesferas de PLGA/Losartan no qual, o tempo de tratamento foi de 8 dias. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com a formulação PLGA/Losartan sob a forma de suspensão não proporcionou um bloqueio significativo do efeito pressor da Ang II quando comparado aos grupos controles.

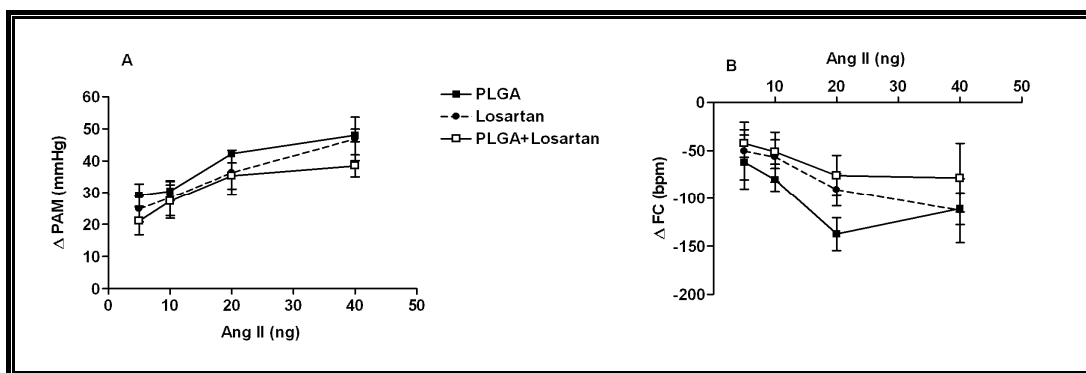


**FIGURA 56** - Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 8 dias de tratamento com a formulação PLGA/Losartan sob a forma de suspensão. A dose de Losartan usada nesses experimentos foi de 3,0 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca. —■— Grupo controle PLGA,  $n = 4$ ; —●— Grupo controle Losartan,  $n = 4$ ; —□— Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 6$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Nos animais do grupo tratado com a suspensão PLGA/Losartan não houve bloqueio significativo da bradicardia reflexa quando a Ang II era infundida por via endovenosa, comparado as respostas obtidas nos animais dos grupos controles.

#### 4.4.2 - DISPOSITIVO EM FORMA DE PASTILHA COMPOSTO POR PLGA/LOSARTAN.

A curva dose-resposta para doses crescentes de Angiotensina II (5, 10, 20 e 40ng/0.1ml) realizada ao final de 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada na forma de pastilha composta por microesferas de PLGA ou PLGA/Losartan está ilustrada na figura 57. No Painel A observa-se que os três grupos experimentais se comportaram de maneira semelhante em relação ao efeito pressor causado pelas doses crescentes de Ang II. Assim, após 8 dias de tratamento, as respostas pressoras do grupo PLGA/Losartan não foram significativamente diferentes daquelas obtidas nos animais dos grupos controles PLGA e Losartan. O mesmo pode ser visto em relação ao efeito bradicárdico mostrado no Painel B. Nesses experimentos a dose de Losartan utilizada foi de 0,7 mg/kg.

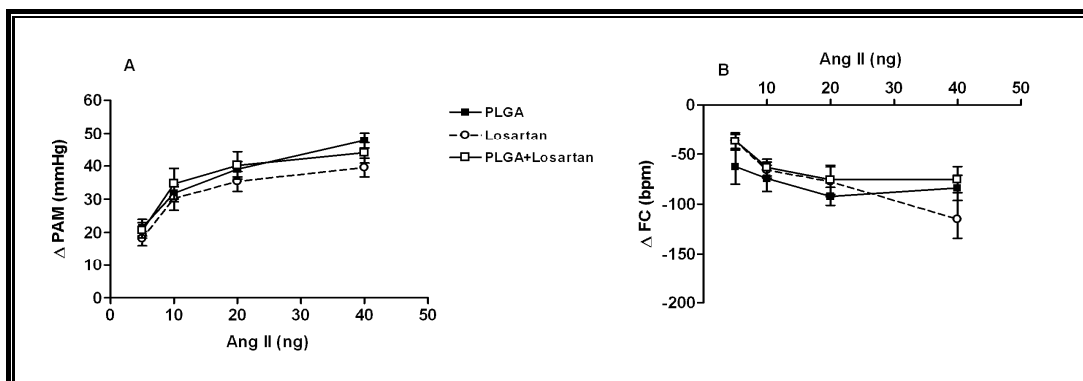


**FIGURA 57** - Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em ratos Wistar normotensos após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha composta pelo polímero PLGA associado ou não ao Losartan na dose de 0,7 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca (FC). —■— Grupo controle PLGA,  $n = 7$ ; -●- Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; —□— Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 8$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

Os mesmos experimentos foram realizados com uma dose de Losartan 4 vezes maior, 3,0 mg/kg, e seus resultados são mostrados nos Painéis A e B da figura 58. Assim como a dose menor de 0,7 mg/kg, a dose maior também não se mostrou eficaz



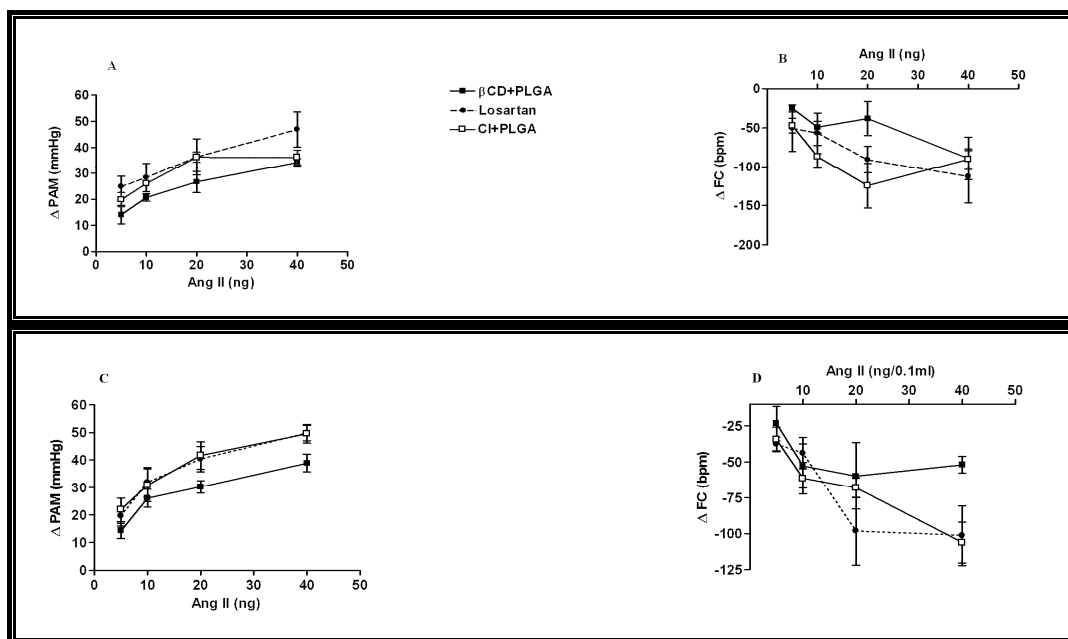
em bloquear tanto o efeito pressor da Ang II como também seu efeito bradicárdico reflexo ao final de oito dias de tratamento com o dispositivo de liberação controlada.



**FIGURA 58** - Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada em forma de pastilha composta pelo polímero PLGA associado ou não ao Losartan na dose de 3,0 mg/kg. **Painel A** representa os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painel B** representa os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca (FC). —■— Grupo controle PLGA,  $n = 7$ ; -●- Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; —□— Grupo tratado PLGA/Losartan,  $n = 8$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

#### 4.4.3 - DISPOSITIVO EM FORMA DE PASTILHA COMPOSTO POR CI/PLGA

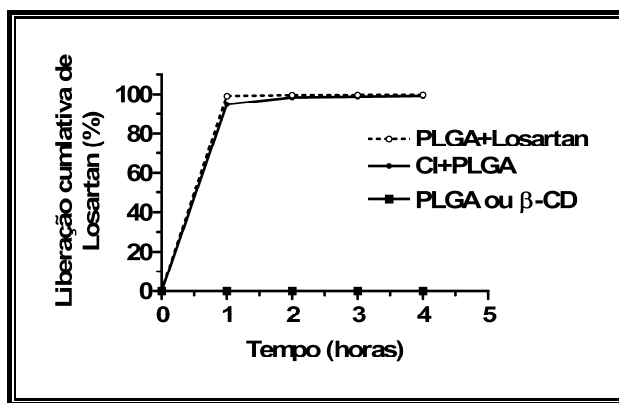
Como pode ser observado nos Painéis A e C da figura 59, o tratamento com o dispositivo na forma de pastilha composta por CI/PLGA não foi capaz de causar bloqueio do efeito pressor da Ang II quando comparado aos tratamentos controles ao final de 8 e 21 dias, respectivamente. Os Painéis B e D da mesma figura mostram os resultados obtidos para os valores de frequência cardíaca. Estes resultados mostram que o tratamento com essa formulação também não alterou de forma significativa a bradicardia reflexa em decorrência do aumento da pressão causada pelo peptídeo, em comparação aos grupos controles. Nesses experimentos a dose de Losartan empregada foi de 0,7 mg/kg no tratamento com duração de 8 dias e de 3.0 mg/kg no tratamento com duração de 21 dias.



**FIGURA 59** - Alterações da PAM e FC obtidas durante o teste do bloqueio do efeito pressor da Angiotensina II em animais normotensos. Os Painéis A e B representam os resultados obtidos após 8 dias de tratamento com dispositivo de liberação controlada de CI/PLGA/β-CD/PLGA na forma de pastilha. Nesses experimentos a dose de Losartan usada foi de 0,7 mg/kg. Os Painéis C e D representam os resultados obtidos após 21 dias de tratamento com a mesma formulação, porém, a dose de Losartan usada foi de 3.0 mg/kg. **Painéis A e C** representam os resultados obtidos para os valores de pressão arterial média (PAM); **Painéis B e D** representam os resultados obtidos para os valores da frequência cardíaca. Nos painéis A e B: Grupo controle β-CD/PLGA,  $n = 4$ ; Grupo controle Losartan,  $n = 5$ ; Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 6$ . Nos painéis C e D: Grupo controle β-CD/PLGA,  $n = 5$ ; Grupo controle Losartan,  $n = 6$ ; Grupo tratado CI/PLGA,  $n = 5$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

#### 4.5 - LIBERAÇÃO DO LOSARTAN IN VITRO A PARTIR DE MICROESFERAS DE PLGA/LOSARTAN E CI/PLGA.

Na figura 60 são mostrados os resultados do experimento de liberação *in vitro* (pH= 7,4) do Losartan realizados no Departamento de Química da UFMG. Nesse experimento verificou-se a ocorrência do “Burst effect” em ambas formulações, ou seja, em uma hora de incubação, aproximadamente 100% do Losartan havia sido liberado no meio. Os valores obtidos foram, respectivamente,  $99.160000 \pm 0.015100$  % para PLGA/Losartan vs  $94.81000 \pm 0.18070$  % para CI/PLGA, e não foram observadas diferenças significativas entre esses valores. O experimento foi realizado durante 72 horas, entretanto na figura 18 são mostradas apenas as primeiras quatro horas para uma melhor visualização dos dados.



**FIGURA 60** - Curvas de liberação *in vitro* (37 °C) de Losartan encapsulado em PLGA ou incluído em  $\beta$ -CD encapsulado em microesferas de PLGA,  $n = 3$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

## 5.0 - DISCUSSÃO

A Angiotensina II, em condições fisiológicas, é de crucial importância para o controle do volume extracelular e da pressão arterial. A estimulação do receptor AT<sub>1</sub> da Angiotensina II mostrou mediar o crescimento e proliferação celular de células musculares lisas vasculares, cardiomiócitos e células coronarianas endoteliais. Assim, o receptor AT<sub>1</sub> tem sido implicado em várias patologias cardiovasculares, renais e cerebrais, tais como hipertrofia ventricular esquerda, hipertrofia da camada media vascular, arritmias cardíacas, ateroscleroses, glomeruloses, infarto e demência (UNGER, 2002).

Vários modelos animais têm sido utilizados com o objetivo de se alcançar um entendimento maior da função da Ang II na gênese e manutenção dessas patologias. Dentre eles, podemos citar os animais espontaneamente hipertensos (SHR), os com hipertensão de origem renovascular como o dois rins – 1 clipe, por exemplo, os transgênicos, os “Knockout” no qual ocorre a ablação total de genes, entre outros.

Os animais com hipertensão renovascular dois rins – 1 clipe possuem uma constrição de uma das artérias renais, enquanto o rim contralateral é mantido intacto, favorecendo a elevação dos níveis pressóricos (CARRETERO & ROMERO, 1977). A expressão de componentes do SRA, desde o precursor glicoprotéico até peptídeos, enzimas e receptores, tem sido alvo na obtenção de animais transgênicos e “Knockout” nos últimos anos. Um dos modelos de animais transgênicos para o SRA é o que hiperexpressa o receptor AT<sub>1</sub> no coração e a ablação única ou dupla de isoformas de receptores AT<sub>1</sub> deu origem aos camundongos e ratos “Knockout” para AT<sub>1</sub> (Carvalho & Santos, 2000).

O uso farmacológico de antagonistas de receptor AT<sub>1</sub>, como o Losartan, nesses modelos, tem promovido a inibição do SRA através do bloqueio direto da ação da

Angiotensina II em nível de receptor. Por conseguinte, o Losartan, tem sido uma sonda farmacológica valiosa para o estudo dos mecanismos de estimulação dos receptores de Angiotensina II (KANG *et al.*, 1994).

De acordo com LANGER (1998), sistemas de liberação sustentada oferecem várias vantagens sobre as formas de dosagem convencionais. Elas oferecem liberação e biodisponibilidade prolongadas da droga, e, deste modo, reduzem a dosagem, os efeitos colaterais e aumentam o conforto do paciente.

Dentre as várias vias de administração de fármacos existentes, a injetável foi a escolhida para a realização deste trabalho, pois, segundo SINISTERRA *et al.*, (2004), sistemas injetáveis tem o benefício de fornecer liberação sustentada de fármacos por meses até anos. Essa liberação controlada é alcançada pela dispersão do fármaco em um carreador polimérico, que funciona como uma barreira e um reservatório para o fármaco (SINISTERRA *et al.*, 2004). Assim, as formulações testadas, tanto em suspensão quanto sob a forma de pastilha, foram administradas por via subcutânea.

Microesferas do polímero PLGA são sistemas de distribuição de fármacos que fornecem proteção para o fármaco encapsulado dentro da matriz polimérica e cuja liberação ocorre numa taxa lenta e contínua (BATYEKY *et al.*, 1997). Este polímero está entre os polímeros biodegradáveis mais conhecidos e é hidrolisado sem a ação de enzimas (HYON *et al.*, 1998), sendo metabolizados pelo corpo (KULKARNI *et al.*, 1966). Dependendo da técnica de preparação das microesferas, as moléculas do fármaco estão dispersas dentro do polímero, depositadas dentro de oclusões esféricas ou aproximadamente esféricas (macroporos) formadas durante o processo (BATYEKY *et al.*, 1997).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos obtidos pela degradação do amido por enzimas, tais como as ciclodextrinas glicosiltransferases, encontradas em

diferentes microorganismos e plantas (BENDER & KOMIYAMA, 1978; HIRAYAMA *et al.*, 1992).

Uma das importantes características das ciclodextrinas é formar complexos de inclusão, tanto em solução quanto no estado sólido, nos quais cada molécula hóspede é envolvida por um ambiente hidrofóbico da cavidade da CD (DUCHÊNE, 1991; UEKAMA, *et al.*, 1987).

Das ciclodextrinas naturais, a  $\beta$ -CD parece ser a mais útil para formar complexos farmacêuticos, por causa das suas habilidades de complexação e baixo custo (BENDER & KOMIYAMA, 1978; HIRAYAMA *et al.*, 1992). A  $\beta$ -CD é degradada no cólon entretanto, tem um longo tempo de residência, ~ 40 horas, o qual ajudaria a aumentar e prolongar a disponibilidade do fármaco para absorção (SINISTERRA *et al.*, 2004).

As ciclodextrinas têm sido usadas com sucesso para modificar as características de liberação de sistemas poliméricos, principalmente na capacidade de formar complexos não covalentes com fármacos, que são espécies com uma solubilidade e/ou difusibilidade diferentes (BIBBY *et al.*, 2000). De acordo com estas considerações, complexação com ciclodextrinas pode oferecer uma ferramenta adicional para modular a taxa de liberação das microesferas de PLGA (FU *et al.*, 1999).

Primeiramente foram realizados experimentos agudos nos quais testou-se a eficiência de duas doses diferentes de Losartan em bloquear o efeito pressor exercido pela Angiotensina II. Os resultados obtidos nesses experimentos mostraram que a maior dose (3,0 mg/kg) se mostrou mais efetiva em bloquear o efeito pressor da Ang II quando comparado a dose de 0,7 mg/kg, duas horas após a sua administração por via subcutânea (figura 7 e 8), apesar da dose de 0,7 mg/kg ter fornecido um bloqueio significativo quando comparado ao veículo, nas doses mais altas de Ang II (20 e 40 ng).

Os resultados obtidos para a frequência cardíaca, nesses mesmos experimentos, estão de acordo com os descritos acima para a pressão arterial média, confirmando a maior efetividade da dose de 3,0mg/kg, visto que, nessa dose ocorreu ausência de bradicardia após a administração de Ang II, o que não pôde ser visto nos experimentos realizados com a dose de 0,7 mg/kg.

Portanto, de acordo com os experimentos iniciais, considerou-se que a melhor dose de Losartan para bloquear aproximadamente agudamente, 100% da resposta pressora da Ang II, quando administrada por via subcutânea, seria a de 3,0 mg/kg e, por isso, essa dose foi escolhida para a realização da maioria dos experimentos subsequentes.

Frente aos resultados citados acima para a resposta pressora da Ang II duas horas após a administração de Losartan, iniciamos os testes agudos com as formulações de nosso interesse (PLGA/Losartan e CI/PLGA). Dessa forma, testamos a capacidade de ambas formulações em bloquear o efeito pressor da Ang II, 2, 6, 12, 24, 36 e 48 horas, após a administração destas.

Inicialmente, testamos as formulações sob a forma de suspensão. Essas preparações em suspensão já haviam sido testadas por DE PAULA (2004), porém usando a dose de 1,5 mg/kg de Losartan.

Os experimentos de DE PAULA (2004) demonstraram que o polímero livre de fármaco não apresenta nenhum efeito demonstrável, além de não ter se mostrado irritante ao tecido subcutâneo. Esse achado foi confirmado também em nossos experimentos de acordo com as figuras 9 a 15 e 29 a 35.

Nesses mesmos experimentos de DE PAULA (2004), quando injetadas microesferas de PLGA contendo Losartan, verificou-se uma redução do efeito pressor

da Ang II para aproximadamente 15 mmHg após 2 horas da administração, chegando a 10 mmHg após 48 horas.

Na dose utilizada em nosso trabalho um bloqueio acentuado do efeito pressor da Ang II foi obtido nos animais tratados com a formulação PLGA/Losartan, durante 24 horas de tratamento, quando comparado aos animais tratados com o polímero livre do fármaco. A resposta obtida com administração de Ang II foi semelhante a obtida com veículo, indicando que o bloqueio obtido durante as primeiras 24 horas foi total. O bloqueio conseguido nas horas subseqüentes (36 e 48 horas) também foi significativo. Nesses intervalos as respostas pressoras produzidas por 40 ng de Ang II nos animais tratados com PLGA/Losartan foram semelhantes àsquelas produzidas por 5 ng, mostrando uma redução de aproximadamente 90% da atividade pressora da Ang II, nessa condição.

O grupo de animais tratados apenas com Losartan administrado por via subcutânea, serviu como um controle da formulação. Quando foram comparados os animais tratados com a formulação aos tratados com Losartan, notamos que com 2, 6, 12 24. 36 e 48 horas de tratamento, os dois grupos experimentais se comportaram de forma semelhante em relação ao bloqueio do efeito pressor, não existindo diferença significativa entre eles. No entanto, a partir das 24 horas, as respostas pressoras causadas pela Ang II, nos animais tratados com Losartan, começaram a retornar aos valores iniciais obtidos na curva controle realizada após administração de solução salina, enquanto as respostas obtidas no grupo PLGA/Losartan continuaram acentuadamente reduzidas.

Os dados da frequência cardíaca obtidos para cada grupo experimental estão de acordo com o que foi observado com a pressão arterial média durante as 48 horas de tratamento. A ausência de bradicardia reflexa nos animais tratados tanto com



PLGA/Losartan quanto com Losartan livre foi uma consequência do bloqueio da resposta pressora nesses animais. Essa resposta foi conseguida durante 48 horas nos animais tratados com PLGA/Losartan e durante 24 horas nos animais tratados apenas com Losartan. Nos animais tratados com polímero, observamos bradicardia reflexa em resposta ao efeito pressor causado pelas doses crescentes de Ang II, durante as 48 horas de tratamento.

Esses resultados mostram que com a utilização de PLGA/Losartan a duração do bloqueio da resposta pressora produzida pela Ang II foi cerca de duas vezes maior do que aquela obtida com Losartan isoladamente.

Baseado nos dados de DE PAULA (2004), que mostram o bloqueio da resposta pressora da Ang II durando por até 10 dias, nossos dados sugerem que o bloqueio do efeito pressor poderia durar por mais de 48 horas. No entanto isso não pôde ser verificado, pois em nossos experimentos, os animais precisavam ser canulados para a realização do teste no sistema de registro utilizado. Isto inviabiliza na maioria das vezes, prolongarmos o período de tratamento por mais de 48 horas, pois acima desse tempo, o membro canulado do animal pode entrar em processo de necrose com a conseqüente produção de substâncias que poderiam interferir nas respostas obtidas durante o experimento.

Uma forma de resolver esse problema seria fazer uso do sistema de aquisição de dados por telemetria. Ele é capaz de registrar parâmetros cardiovasculares tais como pressão sistólica, pressão diastólica, pressão média e frequência cardíaca por meio de um sistema de monitorização composto por três componentes; um cateter-sensor que é implantado na aorta descendente do animal, uma placa receptora de sinal e um sistema para coleta, armazenamento e análise de dados. Estes componentes em conjunto captam, processam e transmitem informações digitalizadas emitindo sinais de dentro do animal

para uma placa receptora que se localiza sob a gaiola do animal e converte o sinal de rádio frequência enviado pelo sensor em sinal digital e o transmite para um multiplexador (matriz).

A vantagem do uso desse sistema é que ele permite a coleta de dados por um período específico de tempo em intervalos regulares ou continuamente por até seis meses. Além de possibilitar a monitorização de até 20 animais em um estudo e coletar dados de quatro animais ao mesmo tempo. Assim, o sistema de aquisição de parâmetros cardiovasculares por telemetria, coleta, armazena e analisa os dados em animais livres de qualquer estresse ou intervenção do pesquisador (LEMOS, 2002).

Logo, nossos dados corroboram parcialmente os dados de DE PAULA (2004), nos quais ele observou que o processo de microencapsulamento do Losartan em PLGA prolongou o efeito antagonista do mesmo, mantendo-o em níveis plasmáticos suficientes para reduzir o efeito da Ang II por até 10 dias.

Os parâmetros farmacocinéticos para uma dose de 50 mg/kg administrada por via oral já são bem estabelecidos. O pico de concentração do Losartan ocorre cerca de 1 hora após administração oral (LO *et al.*, 1995). O pico de concentração do metabólito ativo EXP3174 ocorre 3,5 horas após sua administração. Seguido o alcance dos picos de concentrações, as concentrações de ambos, Losartan e seu metabólito declinam exponencialmente, com uma meia-vida de eliminação média de 2,1 horas para o Losartan e 6,3 horas para o EXP3174. Após 24 horas de dosagem aguda ou crônica, apenas o EXP3174 é detectável no plasma (SHUM *et al.*, 1991). Durante a administração de doses múltiplas, nem o Losartan, nem o EXP3174 são acumulados. A biodisponibilidade oral do Losartan foi de 33% (LO *et al.*, 1995). Entretanto, esses mesmos parâmetros não foram ainda determinados para administração por via

subcutânea, embora DE PAULA (2004) o tenha feito para o Losartan livre e incluído em  $\beta$ -CD.

A segunda formulação testada, que associa as microesferas de PLGA ao CI formado entre o Losartan e a  $\beta$ -CD, forneceu resultados similares àqueles obtidos com a formulação PLGA/Losartan. Da mesma forma que a formulação PLGA/Losartan proporcionou um bloqueio por 48 horas do efeito pressor da Ang II, a formulação CI/PLGA forneceu esse bloqueio por igual período de tempo (figuras 30 a 35). Assim como ocorrido com a formulação PLGA/Losartan, o bloqueio total do efeito pressor durou somente as 24 horas iniciais do tratamento (figuras 30 a 33).

Diferentemente dos resultados obtidos com o grupo Losartan da formulação PLGA/Losartan, o grupo controle Losartan da formulação CI/PLGA exibiu um bloqueio significativo do efeito pressor durante 36 horas, quando comparado aos grupos PLGA e  $\beta$ -CD.

Em nossos experimentos, vimos que o tratamento com CI/PLGA propiciou um bloqueio por 48 horas do efeito pressor da Ang II. Resultados semelhantes também foram obtidos por DE PAULA (2004) nos experimentos com PLGA associado ao CI, porém a dose usada foi de 1,5 mg/kg e com essa dose já foi possível observar uma diminuição de 65% no efeito pressor da Ang II, quando comparado às microesferas livres de fármaco, mantendo este efeito por até 10 dias.

Comparativamente, os resultados obtidos com ambas formulações, PLGA/Losartan e CI/PLGA, administradas em suspensão por via subcutânea sugerem que a formação do composto de inclusão entre o Losartan e a  $\beta$ -CD não foi capaz de aumentar a magnitude do bloqueio do efeito pressor da Ang II quando comparado ao Losartan encapsulado pelas microesferas de PLGA (figuras 49 a 55).

Nos experimentos agudos realizados nesse estudo a adição da  $\beta$ -CD parece não ter acrescentado nenhuma melhora na eficácia da formulação de Losartan. Uma possível explicação para esse fato, novamente reside no período de tratamento. Talvez a extensão desse período para um tempo maior que 48 horas, com os testes do bloqueio do efeito pressor realizados em intervalos regulares pudessem solucionar a questão e evidenciar um prolongamento no bloqueio do efeito pressor da Ang II por esta formulação. Isso poderia ser conseguido com o uso do sistema de telemetria, descrito resumidamente acima.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos agudos, levantamos a hipótese de que ambas as formulações poderiam prolongar o tempo de liberação do Losartan por um período maior que dois dias. Assim, resolvemos testar o bloqueio do efeito pressor da Ang II ao final de 8 dias de tratamento crônico com as formulações PLGA/Losartan e CI/PLGA em dose única.

Para a realização dos experimentos crônicos usamos, além das formulações em suspensão, um dispositivo de liberação controlada sob a forma de pastilha na base PLGA, usado também no trabalho DE PAULA (2004).

Nesses experimentos resolvemos testar, novamente, as duas doses iniciais do Losartan, 0,7 e 3,0 mg/kg, pois de forma crônica, supúnhamos que ambas poderiam bloquear o efeito pressor da Ang II.

Contrariamente ao que esperávamos, os experimentos crônicos não forneceram resultados significativos quanto ao bloqueio do efeito pressor da Ang II para ambas as formulações e doses de Losartan ao final de oito e 21 dias de tratamento (figuras 56 a 59).

Em experimentos realizados por DE PAULA (2004) verificou-se a ocorrência de um fenômeno de liberação chamado “burst effect” ou efeito explosão nas primeiras 8

horas da curva de liberação do Losartan a partir de PLGA, quando comparado à liberação do composto de inclusão. De acordo com LANGER *et al.*, (2001), fármacos solúveis em água provocam uma saturação mais rápida do sistema, uma vez que as interações entre estes e a matriz polimérica são menores, difundindo-se com uma velocidade maior para o meio externo. Segundo DE PAULA (2004) esse resultado sugere o papel modulador da  $\beta$ -CD no perfil de liberação do Losartan.

Em virtude das diferenças observadas com bloqueio crônico entre nossos experimentos e os de DE PAULA, 2004, avaliamos o perfil de liberação *in vitro* do Losartan em ambas formulações. O “bursts effect” observado com nossas preparações diferiu de forma importante dos achados de DE PAULA, 2004, sugerindo que os polímeros utilizados em nosso estudo apresentaram comportamento químico diferente dos anteriormente utilizados, explicando as diferenças observadas *in vivo*. Com nossas formulações, notamos que praticamente 100% do Losartan tinham sido liberados em 1 hora de experimento, provocando, conseqüentemente, o aumento de apenas 1 hora na liberação do mesmo. Interessantemente um retardo de apenas uma hora na liberação do Losartan resultou em aumento da duração do efeito antagonista de cerca de 24 horas. Essa observação sugere que pequenas alterações na taxa de conversão de Losartan em EXP3174 podem resultar em importantes mudanças no nível e duração do bloqueio de receptores AT<sub>1</sub> da Angiotensina II. Isso pode se explicar pela diferença de potência entre o Losartan ( $IC_{50} = 19,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (SOLDNER *et al.*, 1998; BURNIER, 2001) e o EXP3174 ( $IC_{50} = 1,3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (SOLDNER *et al.*, 1998). Nesse sentido, o fato de na formulação utilizada por DE PAULA, 2004, o “burst effect” ter durado cerca de oito horas, seguido de liberação lenta do restante do Losartan, explicaria a maior duração do bloqueio obtido em seus experimentos. A percentagem de Losartan liberada no “burst

effect” foi pequena em comparação com a de nossos experimentos e isso também explicaria a maior duração do bloqueio obtida.

Em resumo, os resultados encontrados nos experimentos agudos indicam que o encapsulamento do Losartan pelas microesferas de PLGA e sua inclusão em  $\beta$ -CD, praticamente dobrou a duração do tempo de ação dessa droga, passando de 24 horas (Losartan livre) para 48 horas (PLGA/Losartan e CI/PLGA). Assim, o sistema de liberação controlada na base PLGA para o Losartan representa um ganho de 24 horas a mais na duração da ação do Losartan e seu metabólito.

Experimentos futuros poderão incluir a dosagem por HPLC do Losartan e seu metabólito ativo EXP3174 no sangue de animais tratados com ambas formulações para traçar o perfil plasmático dessas substâncias e com isso determinar alguns parâmetros farmacocinéticos do Losartan quando administrado por meio de formulações de liberação controlada por via subcutânea.

Mais importante, o encapsulamento do Losartan em polímeros com menor velocidade de hidrólise e que apresentem um menor “burst effect” para o Losartan poderão possibilitar o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de Losartan para estudos experimentais.

## **6.0 - CONCLUSÃO**

A incorporação do Losartan em PLGA aumenta a duração de seu efeito antagonista de 24 horas para 48 horas, sugerindo que PLGA e outros polímeros biodegradáveis podem ser utilizados para preparação de sistemas de liberação controlada para o Losartan.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBAKR, O., ZHANG, J.S. Recent **progress in sustained/controlled oral delivery of captopril: an overview**. International Journal of Pharmaceutics, v.194:139-146, 2000.
- AMODEO, C., ELIUDEM G. L., VASQUEZ, E. **Hipertensão arterial**. Ed. Saraiva, São Paulo: Savier, 1997.
- ATLAS, S. A. **The rennin-angiotensin system revisited: Classical and nonclassical pathways of angiotensin formation**. The Mount Sinai Journal of Medicine, v. 65, 87-96, 1998.
- BADER, M.; PETERS, J.; BALTATU, O.; MULLER, D. N.; LUFT, F. C.; GANTEN, D. **Tissue rennin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research**. J Mol Med, v. 79: 76-102, 2001.
- BATYEKY, R. P.; HANES, R.; LANGER, R.; EDWARDS, D. A. **A Theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegradable microspheres**. Journal of Pharmaceutical Science. v. 86: 1464-1477, 1997.
- BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCHER, J.G. **Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems**. Int. J. Pharm. v: 197: 1-11, 2000.
- BENDER, M. L.; KOMIYAMA, M. **Cyclodextrin chemistry**. Springer-Verlag, Berlin, 1998.
- BRUNNER, HR.; KIRSMAN DJ.; SEALEY JE. **Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms**. Science, v. 174: 1344-1346, 1971.
- BURNIER, Michel. **Angiotensin II type 1 receptor blockers**. Circulation, v. 103: 904-912, 2001.



- CARRETERO, O., ROMERO, J. C. **Production and Characteristics of experimental hypertension in animals.** Edited by Gemest, J., Koiw, E. and O. J. Ki, New York. McGraw Hill, 1977.
- CHAPPEL, M. C; IYER, S. N; DIZ, D. I; FERRARIO, C. M. **Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7).** Brazilian Journal of Medical and Biological research, v. 31, 1205-1212, 1998.
- CHRISTEN, Y.; WAEBER, B.; NUSSBERGER, J. **Oral administration of DuP753, a specific angiotensina II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensina I and II.** Circulation, v. 83: 1333-1342, 1991.
- COLLISTER, JOHN P; HORNFEELDT, Barbara j; OSBORN, John W. **Hypotensive response to Losartan in normal rats – Role of AngII and the area postrema.** Hypertension, v. 27(part 2), 598-606,1996.
- CRACKOWER, MICHAEL A. *et al.* **Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function** Nature, v. 417: 422-428, 2002.
- CSIKOS, T.; CHUNG, O.; UNGER, TJ. **Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT<sub>2</sub> receptor.** Hum. Hypertens. V. 12(5): 311-8, 1998.
- DE GASPARO, M.; CATT, KJ.; INAGAMI, T.; WRIGHT, JW.; UNGER, TH. **International union of pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors.** Pharmacol. Rev. V. 52(3): 415-472, 2000.
- DE PAULA, W. X. **Preparação e caracterização de dispositivos de liberação controlada de Losartan utilizando ciclodextrinas e polímeros biodegradáveis.** Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

- DZAU, V. J. **Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis.** *Circulation*, v. 77(suppl 1): 4-13, 1988.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON, S. **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxipeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9.** *Circ Res*, 87: e1-e9, 2000.
- DUCHÊNE, D., PONCHEL, G., WOUESSIDJEWÉ, D. **Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles.** *Adv Drug Deliv Rev.*, v. 36(1): 29-40, 1999.
- DUCHÊNE, D. **New trends in cyclodextrins and derivatives.** Editions de Santé. Paris, 1991.
- FERRARIO, C. M., MILSTED, A., SANTOS, R. A. S. **Renin, converting enzyme and angiotensina peptides: a review.** In: Keane WF., ed. *A focus on the clinical effects of a long-Acting ACE inhibitor/Hypertension.* New York, Raven press, pp 1-19, 1990.
- FERREIRA, A. M., SANTOS, R. A. S. **Cardiovascular actions of Ang 1-7.** *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, v. 38: 499-507, 2005.
- FU, K.; GRIEBENOW, K.; HSICH, L.; KLIBANOV, A. M.; LANGER, R. **FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres.** *J. Control. Release*, v. 58: 357-366, 1999.
- HIRAYAMA, F.; YAMAMOTO M.; UEKAMA, K. **Acid-catalyzed hydrolysis of maltozyl- $\beta$ -cyclodextrin.** *J. Pharm. Sci.*, v.81: 913-916, 1992.
- HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. **Cyclodextrin-based controlled drug release system,** v.36: 125-141, 1999.
- HYON, S. H.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y. **Effects of the residual monomer on the degradation of DL-lactide polymer.** *Polymer International*, v.46: 196, 1998.

- JAIN, R., SHAH, N.H., MALICK, A.W. **Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches.** Drug Dev Ind Pharm., v.24(8): 703-727, 1998.
- JALIL, R., NIXON, J.R. **Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties.** J Microencapsul., v.7(3): 297-325, 1990.
- KAMBAYASHI, Y.; BARDHAN, S.; TAKAHASHI, K. **Molecular cloning of a novel angiotensina II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition.** J Biol. Chem. v. 268: 24543-24546, 1993.
- KAMBAYASHI, Y.; BARDHAN, S.; TAKAHASHI, K. **Molecular cloning of a novel angiotensina II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition.** J Biol. Chem. v. 268: 24543-24546, 1993.
- KANG PM, LANDAU AJ, EBERHARDT RT, FRISHMAN WH. **Angiotensin II receptor antagonists: a new approach to blockade of the renin-angiotensin system.** American Heart Journal. v. 127(5):1388-401, 1994.
- KIM S & IWAO H. **Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases.** Pharmacol Rev. v. 52 (1): 11-34, 2000.
- KRIEGER, E M; SANTOS, ROBSON A. S. *Angiotensinas – Aspectos Fisiológicos.* Hipertensão, v.1: 7-10, 1998.
- KULKARNI, R. K.; PANI, K. C. NEUMAN, C.; LEONARD, F. **Polylactic acid for surgical implants.** ARCH. SURG., v.93: 839-43, 1966.
- LANGER, R. **New methods of drug delivery.** Science, V.249 (4976): 1527-1533, 1990.
- LANGER, R.; CHOEN, S.; YOSHIOKA, T.; LUCARELLI, M. **Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres.** Pharm. Res, V.8(6): 713-720, 1991.

- LANGER, R. **Drug delivery and targeting.** Nature, v.392 (Supp): 5-10, 1998.
- LANGER, R.; PEREZ, C.; SANCHES, A.; PUTNAM, D. **Poly (lactic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA.** J. Control. Release, V.75 (1-2): 211-224, 2001.
- LAURENCIN, C.T, LANGER, R. **Polymeric controlled release systems: new methods for drug delivery.** Clin Lab Med. v. 7(2):301-323, 1987.
- LIMA, K.M., JÚNIOR, J.M.R. **Poly-dl-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. V.32: 171-180, 1999.
- LEMONS, M. DA S. **Sistema renina-Angiotensina no controle da variação circadiana de parâmetros cardiovasculares e resposta ao estresse de contenção em ratos jovens e idosos.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- LO, M. W.; GOLDBERG, M. R.; MCCREA, J. B.; LU, H.; FURTEK, C. I.; BJORNSSON, T. D. **Pharmacokinetics of Losartan, an angiotensina II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans.** Clin Pharmacol. Ther. v. 58: 641-649 1995.
- LOFTSSON, T. **Cyclodextrins in pharmaceutical formulation. The effects of polymers on their complexation efficacy and drug availability.** A report prepared for Nordic Industrial Fund, 1998.
- LOFTSSON, T., MASSON, M. **Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice.** International Journal of Pharmaceutics, v.225: 15-30, 2001.
- MILSTED, A. BARNA, B.P., RANSOHOFF, R.M., BROSNIHAN, K.B., FERRARIO, C.M. **Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen**

- m RNA.** Proceeding of the National Academy of Sciences, USA, 87: 5720-5723, 1990
- MCINTYRE, M. CAFFE, S.E., MICHALAK, R.A., REID, J.L. **Losartan, an orally active angiotensin (AT<sub>1</sub>) receptor antagonist: A review of its efficacy and safety in essential hypertension.** Pharmacol. Ther., v.74(2): 181-194, 1997.
- OKAMURA, T; MIYAZAKI, M; INAGAMI, T; TODA, N. **Vascular rennin-angiotensin sytem in Two-kidney, one clip hypertensive rats.** Hypertension, v. 8, 560-565, 1986.
- OHKUBO, N.; MATSUBARA, H.; NOZAWA, Y. **Angiotensin Type II receptors are re-expressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism.** Circulation. v. 96: 3954-3962, 1997.
- PANCHAGNULA, R., DHANIKULA, A.B., PILLAI, O. **Drug delivery: an odyssey of 100 years.** Current Opinion in Chemical Biology. v. 5, p. 439-446, 2001.
- RIBEIRO, W; MUSCARÁ, M. N. **Pharmacohinetic characteristics of calcium antagonists, ACE inhibitors and angiotensin II antagonists in humans.** Rev. Bras. Hipertens., v. 8 (1), 114-124, 2001.
- ROBINSON, J.R. **Controlled drug delivery: past, present, and future.** Controlled Drug Delivery, Challenges and Strategies. v.1: 1-10, American Chemical Society, Washington, DC, 1997.
- SANTOS, R. A. S.; CAMPGNOLE-SANTOS, M. J.; ANDRADE, S. P. **Angiotensin-(1-7): an update.** Regulatory Peptides. V. 91: 45-62, 2000.
- SANTOS, R. A.; SIMOES E SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; DE BUHR, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.;

- SPETH, R.; WALTHER, T. **Angiotensin (1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas**. PNAS, V. 100 (14): 8258-8263, 2003a.
- SANTOS, R. A. S.; HAIBARA, A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SIMÕES E SILVA, A. C.; PAULA, R. D.; PINHEIRO, S. V.; LEITE, M. F.; LEMOS, V. S.; SILVA, D. M.; GUERRA, M. T.; KHOSLA, M. C. **Characterization of a new selective antagonist for angiotensin (1-7), D-Pro<sup>7</sup>-Angiotensin (1-7)**. Hypertension, V. 41 (part 21): 737-743, 2003.
- SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. **Central and peripheral actions of angiotensina 1-7**. Braz. J. Med. Bio. Res. 27:1033-1047, 1994
- SANTOS, R. A. S.; SAMPAIO, W. O. **Hipertensão**, v.5 (2): p. 26-35, 2002
- SCHMIDT, B.; SCHIEFFER, B. **Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites**. Journal of Medicinal Chemistry, v. 46 (12): 2261-2270, 2003.
- SHUM, L.; BENEDEK, I. H.; QUON, C. Y.; ROBINSON, C. A.; BORLAND, R. M. **Pharmacokinetics of Dup-753 (MK-954) in healthy male volunteers after single oral ascending doses**. Pharm. Res. v. (8): 5310, 1991.
- SINISTERRA, R. D., DE PAULA, W. X., Frezard, F.; SANTOS, R. A. S. **A once-a-week sustained release oral formulation of the Angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonist, Losartan**. Resultados não publicados.
- SINISTERRA, R. D., DE PAULA, W. X., SHASTRI, P. V.; BRAGA, A. N. G.; BRANT, S. V.; SANTOS, R. A. S., FREZARD, F. **Preparation of formulations of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonists for the treatment of arterial hypertension, others cardiovascular illnesses and its complications**. Patent WO02080910A1, 2002.
- SOLDNER, A., SPAHN-LANGGUTH, H., PALM, D., MUTSCHLER, E. **A radioreceptor assay for the analysis of AT<sub>1</sub> receptor antagonists. Correlation with complementary**

- LC data reveals a potential contribution of active metabolites.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis. v. 17: 111-124, 1998.
- TIMMERMANS, P. B. M. W. M.; WONG, P. C.; CHIU, A. T; HERBLIN, W. F; BENFIELD, P.; CARINI, D. J; LEE, R. J.; WEXLER, R. R.; SAYE, J. A. M.; SMITH, R. D. **Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists.** The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics v. 45 (2), 205-250, 1993.
- TIPNIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. **A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase.** J Biol Chem. V. v. 275(43): 33238-43, 2000.
- THOMSON, R. C.; ISHAUG, S. L.; MIKOS, A. G.; LANGER, R. **Polymers for Biological Systems.** The encyclopedia of molecular biology: fundamentals and applications, v.9: 31-44, 1993.
- THURMAN, J. M.; SCHRIER, R. W. **Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on blood pressure and the kidney.** Am J Med, v. 114: 588-598, 2003.
- TOUYZ, R. M.; BERRY, C. **Recent advances in angiotensin II signaling.** In press, 2001.
- TRAPANI, G.; LOPEDOTA, A.; BOGHETICH, G.; LATROFA, A.; FRANCO, M. **Encapsulation and release of the hypnotic agent zolpidem from biodegradable polymer microparticles containing hydroxypropyl-beta-cyclodextrin.** Int. J. Pharm., V. 268 (1-2): 47-57, 2003.
- TURNER, A. J.; HOOPER, N. M. **The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology.** TRENDS Pharm Sci 23(4): 177-183, 2002

- UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. **Cyclodextrins in drug carrier systems.** CRC Crit. Rev. Ther. Drug carrier syst., v. 3: 1-40, 1987.
- UEKAMA, K., IRIE, T. **Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation.** Journal of Pharmaceutical Science, v. 86(2): 147-162, 1997.
- UNGER, T. **The role of the rennin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease.** American Journal of cardiology, v. 89 (suppl): 3A-10A, 2002.
- VERGER, M. L, FLUCKIGER, L.; KIM, Y.; HOFFMAN, M. **Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent.** European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceuticals, v.46: 137-143, 1998.
- VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. **Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives.** British Journal of Pharmacology, v. 139, 191-202, 2003.
- VICKERS, C.; HALED, P.; KAUSHIK, V.; GAVIN, J.; TANG, J.; GODBOUT, K.; PARSONS, T.; BARONAS, E.; HSIEH, F.; ACTON, S.; PATANE, M.; NICHOLS, A.; TUMMINO, P. **Hydrolysis of biological peptides by human angiotensina-converting enzyme-related carboxypeptidase.** J. Biol. Chem. V. 277(17): 14838-43, 2002.
- WALTER, R.; SIMMONS, W. H.; YOSHIMOTO, T. **Proline specific endo- and exopeptidases.** Mol Cell Biochem. V. 30(2): 111-127, 1980.
- WEIR, M. R.; DZAU, V. J. **The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management.** Am J Hypertens, v. 12 (suppl): 205s-213s, 1999.



---

WHITE, M.; RACINE, N.; DUCHARME, A.; DE CHAMPLEIN, J. **Therapeutic potential of angiotensina II receptor antagonists.** Expert Opin. Investig. Drugs, v. 10 (9): 1687-1701, 2001.