

Efecto del Ayuno sobre la Absorción de Clorhidrato de Metoclopramida. I. Modelo *in vitro*

MARIA GUILLERMINA VOLONTE, SUSANA A. TAYLOR, CLAUDIA G. MARANO,
MARIA ISABEL REINOSO* y PABLO LUFRANO

*Cátedra de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,
calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina*

RESUMEN. Se estudia el efecto del ayuno sobre la absorción gastrointestinal de clorhidrato de metoclopramida mediante un modelo *in vitro* que utiliza estómagos y segmentos intestinales de ratas, unas sometidas a un ayuno de 16 horas y otras liberadas a una dieta a voluntad. Se realiza un perfil de velocidad de transferencia de la droga durante un determinado período. Los resultados muestran una mayor velocidad para los intestinos de ratas en ayuno respecto a los provenientes de ratas alimentadas, y un marcado aumento de clorhidrato de metoclopramida transferida desde intestino en comparación con estómago.

SUMMARY. "Fasting Effect on Absorption of Metoclopramide Hydrochloride. I. *In vitro* model". The effect of fasting on gastrointestinal absorption of metoclopramide hydrochloride is studied by means of an *in vitro* model using stomachs and intestinal segments of rats, some of them fasting during 16 hours and the others eating at will. A drug transference rate profile is made during certain period. The results show higher transference rate for the fasting rats with regard to the fed rats and a remarkable increase of metoclopramide hydrochloride transferred from the intestine compared to stomach.

INTRODUCCION

El uso de modelos que operan con membranas naturales resulta un artificio ampliamente justificado en el estudio de la absorción de sustancias relacionadas químicamente¹⁻⁴, o bien, como es nuestro propósito, en el análisis de diversos factores que influyen en la transferencia de un principio activo desde el sitio en que es depositado al compartimiento central⁵⁻⁸.

Estos modelos pueden ser montados *in vitro* o bien *in situ*; en los primeros el estó-

mago o los segmentos de distintas regiones del intestino delgado son separados del animal de experimentación, en tanto que en los segundos se aplica fundamentalmente la técnica del "loop"⁹⁻¹¹.

La separación mecánica de un órgano desde el animal intacto implica ventajas y desventajas. En un sentido permite controlar el medio ambiente de la preparación aislada y evaluar algunos efectos de ciertas propiedades fisicoquímicas de la droga en el proceso de absorción a través de las mem-

* Becaria de Iniciación del Departamento Científico del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE: Absorción *in vitro*; Clorhidrato de metoclopramida; Efecto del Ayuno; Velocidad de Transferencia

KEY WORDS: *In vitro* absorption; Metoclopramide Hydrochloride; Fasting Effect; Transfer Rates

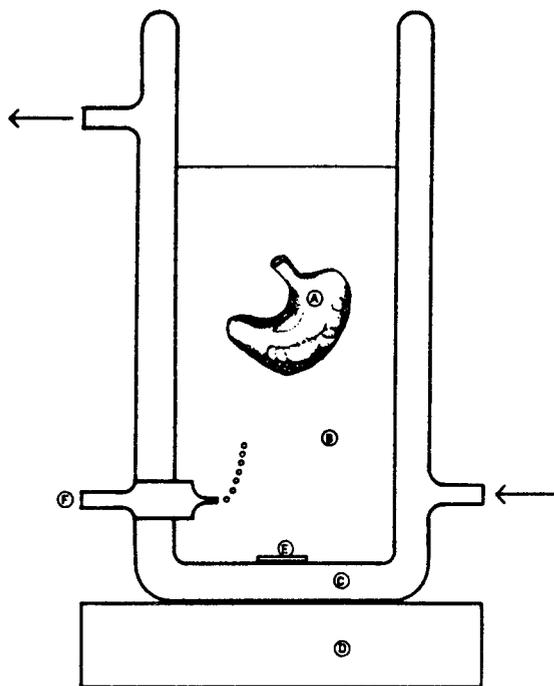


Figura 1. Diagrama del equipo utilizado en el modelo de absorción *in vitro*. A: estómago; B: solución plasmática; C: circulación agua 37 °C; D: agitador magnético; E: buzo; F: burbujeo de aire.

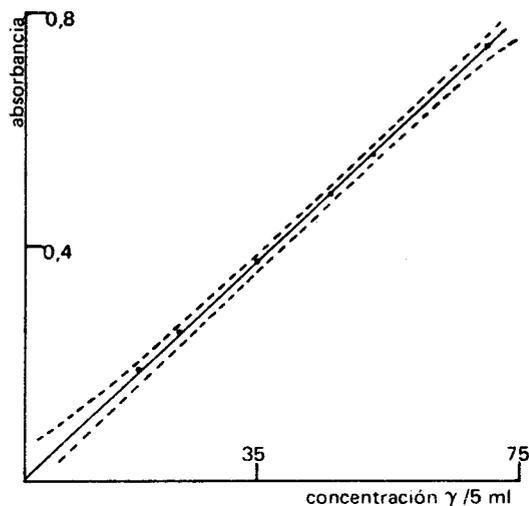


Figura 2. Curva de calibración de clorhidrato de metoclopramida. Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 4 determinaciones. Abscisa: valores de concentración en $\gamma/5$ ml. El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión ó que $\beta = 0$. $r = 0,9989$; $Y = 0,00294 + 0,0106 X$; las líneas punteadas representan el intervalo de confianza para $\alpha = 0,05$.

PARTE EXPERIMENTAL

Modelo de absorción *in vitro*

De grupos de ratas Sprague Dowley de 200 ± 20 gramos de peso sometidas a un ayuno de 16 horas y a dieta a voluntad, anestesiadas con éter, se aislan estómagos y dos trozos de intestino de 12 cm de longitud de la zona del ileon, a partir de un punto ubicado a 10 cm del píloro. Los órganos son lavados con solución Krebs a 37 °C, preparada a pH 1 y 3 para el estómago, según provengan de ratas en ayuno o no, respectivamente, y a pH 6 en el caso de los segmentos intestinales.

Con los mismos se confeccionan "sacos" conteniendo 2 ml de solución de clorhidrato de metoclopramida de 1,9 mg/ml, de manera de no modificar la capacidad normal de los mismos. El clorhidrato de metoclopramida fue recristalizado desde clorformo y vehiculizado en solución Krebs a los valores de pH indicados anteriormente.

branas naturales; en otro aspecto, el traumatismo ocasionado al órgano puede provocar alteraciones o bien eliminar la influencia de ciertos factores en este proceso.

Di Colo y colaboradores¹² hacen una recopilación de 102 referencias sobre las técnicas *in vitro*, con membranas naturales, y a pesar de coincidir en señalar ciertas limitaciones, concluyen avalando este modelo en el estudio de absorción, en la etapa de preformulación y como una aproximación del comportamiento *in vivo*.

En la presente publicación analizamos la gravitación del ayuno en la absorción de clorhidrato de metoclopramida, utilizando como modelos estómagos y segmentos de intestinos aislados de ratas, de las cuales un grupo fue sometido a un ayuno de 16 horas y otro liberado a una dieta a voluntad.

Tiempo (min)	Velocidad de transferencia intestinal (γ /min)	
	Ayuno n = 13	No ayuno n = 10
10	5.62	4.50
20	7.28	5.45
40	9.37	6.52
60	9.99	7.10
80	10.63	7.22
100	10.06	7.31
120	10.20	7.33

Tabla 1. Velocidad de transferencia de clorhidrato de metoclopramida en función del tiempo, desde intestinos de ratas en condiciones de ayuno y de no ayuno.

Los "sacos" son sumergidos en 100 ml de un medio plasmático artificial -solución de Krebs pH 7,4- a una temperatura de 37 °C, con burbujeo constante de aire y bajo agitación magnética, como indica la Fig. 1.

A fin de seguir la cinética de transferencia del clorhidrato de metoclopramida, durante 2 horas se retiran alícuotas de 5 ml del medio plasmático, reponiendo el volumen muestreado.

Metodología analítica. Mediante el método de diazopulación con diclorhidrato de N(1-naftil)etilendiamina^{13, 14} se cuantifica la droga, interpolando la absorbancia de las muestras en una curva de calibración registrada a 540 nm, confeccionada con soluciones de clorhidrato de metoclopramida de 1,7-7 γ /ml, preparadas en una solución Krebs a pH 7,4, previamente incubada durante 120 minutos con "sacos" conteniendo tan sólo solución nutriente (Fig. 2).

RESULTADOS Y DISCUSION

La cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida registrada a cada tiempo en el medio plasmático artificial se divi-

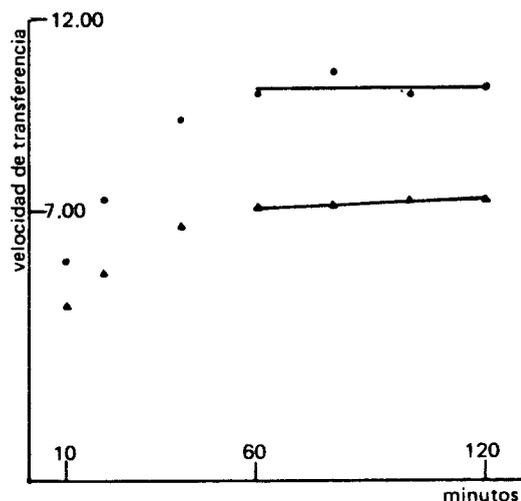


Figura 3. Velocidad de transferencia de clorhidrato de metoclopramida a través de intestino delgado de ratas sometidas a ayuno (-●-) y con dieta a voluntad (-▲-), en función del tiempo.

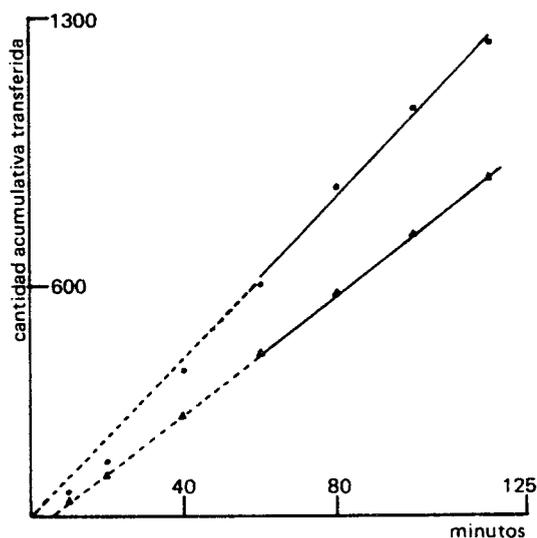


Figura 4. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida a través de intestino delgado de rata en función del tiempo. En ayuno (-●-); $r = 0,995$; $Y = -3,4 + 10,42 X$. No en ayuno (-▲-); $r = 0,9997$; $Y = -28,6 + 7,58 X$; $F = 245,68$.

Tiempo (min)	Cantidad acumulativa transferida desde intestino (γ /ml)		
	Ayuno n = 13		No Ayuno n = 10
10	56.23 \pm 2.67	NS	45.12 \pm 8.06
20	145.53 \pm 7.20	AS	109.08 \pm 10.49
40	374.80 \pm 19.14	AS	260.64 \pm 26.80
60	599.60 \pm 26.86	AS	426.12 \pm 44.70
80	850.99 \pm 35.57	AS	577.53 \pm 54.81
100	1063.19 \pm 45.92	AS	730.77 \pm 71.02
120	1223.80 \pm 56.52	AS	880.19 \pm 82.91

Tabla 2. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida desde intestino de ratas. Los valores tabulados corresponden a valores medios \pm desviación típica de la media. NS = Diferencias no significativas. AS = Diferencias altamente significativas.

Tiempo (min)	Cantidad acumulativa transferida desde intestino en ayuno (γ /ml)		
	Segmento proximal n = 7		Segmento distal n = 6
10	58.12 \pm 3.84	NS	54.03 \pm 3.82
20	155.60 \pm 10.75	NS	133.80 \pm 7.54
40	377.40 \pm 33.34	NS	371.90 \pm 18.60
60	617.03 \pm 39.79	NS	579.30 \pm 37.10
80	857.44 \pm 57.70	NS	843.50 \pm 43.50
100	1055.30 \pm 75.00	NS	1072.40 \pm 55.30
120	1201.40 \pm 90.20	NS	1250.00 \pm 70.40

Tabla 3. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida desde el segmento intestinal proximal y distal de ratas en ayuno. Los valores tabulados corresponden a valores medios \pm desviación típica de la media. NS = Diferencias no significativas.

Tiempo (min)	Cantidad acumulativa transferida desde intestino en No Ayuno (γ /ml)		
	Segmento proximal n = 5		Segmento distal n = 5
10	49.76 \pm 15.20	NS	40.50 \pm 7.21
20	107.50 \pm 19.38	NS	110.60 \pm 11.00
40	265.20 \pm 40.38	NS	256.10 \pm 40.10
60	434.40 \pm 72.20	NS	417.80 \pm 61.60
80	594.16 \pm 85.60	NS	560.91 \pm 78.25
100	760.56 \pm 113.30	NS	701.07 \pm 97.74
120	916.02 \pm 127.80	NS	844.40 \pm 118.80

Tabla 4. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida desde el segmento intestinal proximal y distal de ratas en no ayuno. Los valores tabulados corresponden a valores medios \pm desviación típica de la media. NS = Diferencias no significativas.

Tiempo (min)	Cantidad acumulativa transferida desde estómago (γ /ml)	
	Ayuno n = 6	No Ayuno n = 8
10	16.03 \pm 3.39	--
20	21.76 \pm 6.42	--
40	39.13 \pm 9.56	--
60	62.43 \pm 10.18	--
80	92.90 \pm 11.20	--
100	129.59 \pm 16.34	--
120	187.53 \pm 23.22	31.32 \pm 12.13

Tabla 5. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida desde estómagos de rata. Los valores tabulados corresponden a valores medios \pm desviación típica de la media.

de por el tiempo correspondiente para obtener así la velocidad de transferencia (γ /min). Estos valores son representados en función del tiempo.

El tiempo al cual la velocidad de transferencia adquiere un valor constante puede ser considerado como el punto de partida de un estado estacionario en la transferencia de la droga.

En la Tabla 1 y en la Fig. 3 se ordenan los valores de velocidad de transferencia como una función del tiempo para el clorhidrato de metoclopramida desde los intestinos, tanto de ratas en ayuno como de aquellas que recibieron una dieta a voluntad. En ambos casos podemos observar que el tiempo en el cual se inicia el estado estacionario es de aproximadamente 60 minutos.

Con las cantidades acumulativas de la droga transferida a los tiempos que definen el estado estacionario se calcula la velocidad de transferencia en el mismo. La Fig. 4 muestra la relación lineal entre ambas variables; las pendientes fueron obtenidas mediante la ecuación de regresión calculada por el ajuste lineal de cuadrados mínimos. La comparación de las pendientes utilizando el Test de Fischer para la diferencia entre dos coeficientes de regresión muestra diferencias altamente significativas.

En la Tabla 2 aparecen las cantidades

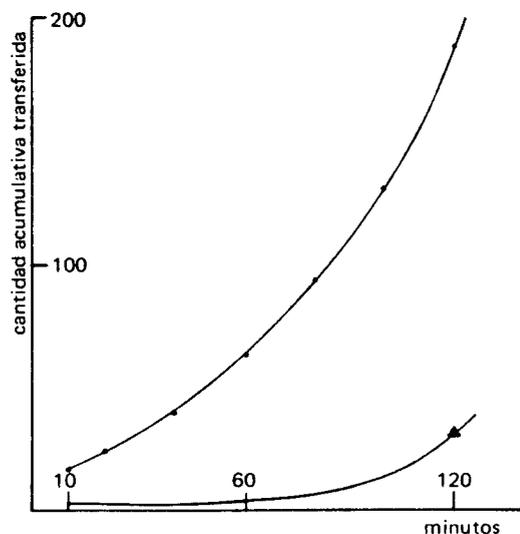


Figura 5. Cantidad acumulativa de clorhidrato de metoclopramida transferida a través de estómago de ratas sometidas a ayuno (—●—) y con dieta a voluntad (—▲—), en función del tiempo.

acumulativas en función del tiempo para las condiciones de alimentación ensayadas con los intestinos; se ha utilizado el Test de Student para compararlas, observándose diferencias altamente significativas a partir de los 20 minutos.

Puesto que durante las experiencias se utilizaron dos segmentos del intestino delgado de cada rata, se realizó para cada tiempo el análisis de Student para comparar la

transferencia de la droga desde uno y otro trozo; no se observan diferencias significativas entre los segmentos proximal y distal de las preparaciones intestinales, tanto de ratas en ayuno como de las que se alimentaron a voluntad (Tablas 3 y 4).

Los resultados obtenidos con los estómagos se muestran en la Tabla 5 y se representan en la Fig. 5. Para el caso de ratas con dieta a voluntad recién a partir de los 120 minutos es posible detectar clorhidrato de metoclopramida en el medio plasmático artificial.

Los resultados muestran una mayor velocidad de transferencia para los segmentos intestinales de ratas en ayuno en comparación con los provenientes de ratas alimentadas. Estos indican también que en los trozos intestinales hay un marcado aumento de clorhidrato de metoclopramida transferida, respecto a la registrada a partir de estómagos.

Es conocido que la presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal modifica la disponibilidad de drogas para la absorción¹⁵. Esta influencia puede deberse a que las mismas se complejan con los productos

alimenticios, provocando una disminución en su transferencia a través de la membrana. A pesar de que los trozos intestinales utilizados en nuestros modelos son lavados, quizás restos de sustancias alimenticias no eliminados pueden interaccionar con el clorhidrato de metoclopramida, justificando así la diferencia observada.

Al distinto comportamiento de absorción apreciado en el estómago a pH 1 y 3 no le hallamos justificación según la teoría de partición por pH, debido a que la relación de droga ionizada-no ionizada es elevada a dichos pH. Nos inclinamos a pensar que a pH 1 ocurre un cambio en las propiedades de la membrana que incide en la transferencia del clorhidrato, habiéndose previsto estudiar el comportamiento observado a efectos de evaluar la influencia del pH sobre la integridad de la membrana.

AGRADECIMIENTOS. Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires y a COFARQUIL por financiar en parte el presente trabajo; al Laboratorio de Botánica Aplicada por facilitarnos el uso del Espectrofotómetro Beckman M 26 y a Laboratorios Bagó, Planta City Bell, por el suministro de los animales de experimentación utilizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vigano, V., B. Sardi, F. Rognoni y M.R. Podestá (1977) *Il Fármaco Ed. Pr.* 32: 530-6
2. Arena, C. y Ho-Leung Fung (1980) *J. Pharm. Sci.* 69: 356-8
3. Cascella, P.J. y S. Feldman (1980) *J. Pharm. Sci.* 69: 643-7
4. Sasaki, H., T. Takahashi, J. Nakamura, R. Konishi y J. Shibasaki (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 676-9
5. Sakai, K., T. Matsuura Kutsuna, T. Nishino, Y. Fujihara y N. Yata (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 387-90
6. Patel, V.S. y W.G. Kramer (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 275-7
7. Amidon, G.L., A.E. Merfeld y J.B. Dressman (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 363-8
8. Nakashima, E., K. Yokogawa, F. Ichimura, T. Hashimoto y A. Tsuji (1987) *J. Pharm. Sci.* 76: 10-3
9. Koysooko, R. y G. Levy (1974) *J. Pharm. Sci.* 63: 829-34
10. Tsuji, A., E. Nakashima, I. Kagami y T. Yamana (1981) *J. Pharm. Sci.* 70: 768-72
11. Suzuka, T., T. Nishihata, M. Yamazaki y A. Kamada (1985) *Chem. Pharm. Bull.* 33: 4600-5
12. Di Colo, G., S. Manzi y E. Nannipieri (1981) *Il Fármaco Ed. Sci.* 36: 692-704
13. Pitel, G. y Th. Luce (1965) *Ann. Pharm. Franc.* 23: 673-81
14. Shingbal, D.M. y K.V. Sawant (1982) *Indian Drugs* 19: 239-41
15. Doluisio, J.T., G.H. Tan, N.F. Billups y L. Diamond (1969) *J. Pharm. Sci.* 58: 1200-2