UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol
em voluntários saudáveis e em pacientes portadores de diabetes
mellitus tipo 2**

Glauco Henrique Balthazar Nardotto

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol
em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes
mellitus tipo 2**

Glauco Henrique Balthazar Nardotto

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol
em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes
mellitus tipo 2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Toxicologia para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Glauco Henrique Balthazar Nardotto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Toxicologia em 19/08/2015. A Versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

Ficha catalografica

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nardotto, Glauco Henrique Balthazar
Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do
carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de
diabetes *mellitus* tipo II. Ribeirão Preto, 2015
148p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia

1. Carvedilol; 2. Diabetes *mellitus* tipo II; 3. Enantiômeros; 4.
Farmacocinética populacional; 5. Hidroxifenilcarvedilol; 6. O-
desmetilcarvedilol; 7. Glibenclamida; 8. CYP; 9. Cromatografia quiral

Folha de aprovação

Glauco Henrique Balthazar Nardotto

Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Toxicologia
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais Luiz Antônio de Oliveira Nardotto e Ivone Balthazar Nardotto, exemplos de vida honestidade, que me permitiram acesso à educação e condição para me dedicar à ciência e à busca pelo conhecimento sem os quais nada disso seria possível.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos

Aos voluntários pela indispensável participação no estudo, aqui impessoal e friamente nomeados por números e chamados de voluntários, pacientes ou indivíduos por questões de formalidade, que acobertam o respeito, a estima e o grande obrigado pela contribuição sem a qual nenhuma dessas informações seriam produzidas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote, por conceder a oportunidade da realização do doutorado, ensinar-me ciência, pela dedicação na orientação e auxílio na condução do estudo em todas suas fases, não importante a hora do dia.

Ao Prof. Dr. Oscar Della Pasqua, por me conceder a oportunidade de estagiar em seu laboratório de farmacologia clínica populacional na University College London (oportunidade que me fez amadurecer muito profissionalmente), e me abrir as portas da abordagem populacional.

À Dr. Maria Paula Marques Pereira e Dr. Adriana Rocha, funcionárias do laboratório de farmacocinética e metabolismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pelos ensinamentos em cromatografia e espectrometria de massas e auxílio no desenvolvimento do método de análise cromatográfica e nas análises farmacocinéticas e revisões de texto.

Ao Sr. Natalino Bocardo, funcionário do Laboratório de Farmacocinética Clínica da FCFRP-USP, pelo auxílio e pela simpatia contagiante, sempre contribuindo para o bom convívio no grupo.

À equipe de enfermagem das unidades básicas de saúde pela companhia, ajuda e compreensão durante a triagem dos pacientes da pesquisa.

À equipe da unidade de pesquisa clínica do HCFMRP-USP pelo auxílio na condução dos protocolos de coleta de amostras e dados clínicos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacocinética e metabolismo da FCFRP-USP: Profa. Dra. Ana Leonor P.C. Godoy, Dra. Carolina M. Silva, Ms. Carolina P. Vieira, Dr. Daniel V. Neves, Daniela Miarelli, Ms. Diego Cusinato, Dra. Francine A. Castro, Gabriela C. Oliveira, Ms. João P.B. Ximenez, Dra. Juciane L. Cardoso, Dra. Juciene Caris, Leandro F. Pippa, Ms. Leonardo Pinto, Ms. Marília Oliveira, Milena Oliveira, Profa. Dra. Natália V. de Moraes, Dr. Natalícia de J. Antunes, Ms. Otávio P. Rocha, Dr. Osmany Alberto Silva Figueira, Ms. Roberta Cestari, Ms. Rodrigo M.P. Ribeiro, pelas trocas de experiências profissionais e pessoais, pela inestimável ajuda e pelo carinho no nosso convívio diário.

Aos colegas de laboratório na UCL, Sean Oosterholt, Morris Muliaditan e Andreas Matthios pelos ensinamentos de modelagem, operação dos programas e auxílio na elaboração dos modelos, cooperação sem a qual não seria possível a realização dos objetivos no exterior.

Agradeço ainda aos meus amigos de infância com quem convivo até hoje, aos que conheci na saudosa FCFRP-USP, e aos outros que fiz ao longo dos anos, amizades que levarei por toda a vida, que por felicidade são muitas mas que, apesar da importância, não as nomearei individualmente pois seria longamente entediante e, afinal, quando lerem isso saberão que me refiro a cada um.

A todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche.

**Cada um de vocês foi muito importante na realização deste trabalho.
Muito obrigado!**

Resumo

NARDOTTO, G.H.B. **Farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2.** 2015. 148f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O carvedilol é um anti-hipertensivo disponível na clínica como mistura racêmica, sendo o (S)-(-)-carvedilol um bloqueador β e α_1 -adrenérgico e o (R)-(+)-carvedilol apenas α_1 -adrenérgico. O carvedilol é metabolizado principalmente por glicuronidação e pelo CYP2D6 a hidroxifenilcarvedilol e pelo CYP2C9 a O-desmetilcarvedilol. O presente estudo avalia a disposição cinética e o metabolismo dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em voluntários sadios não comedicionados (n=13) ou comedicionados com dose única oral de glibenclamida (5 mg) e metformina (500 mg) (n=13) e em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (com bom controle glicêmico e em tratamento com glibenclamida 5 mg/8h e metformina 500 mg/8h; n=14), fenotipados como metabolizadores rápidos (n=26) ou lentos (n=1). Os voluntários e pacientes receberam dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico e amostras seriadas de sangue foram coletadas até 24h após a administração. A frequência cardíaca foi avaliada na situação de exercício isométrico com o handgrip durante 2 min a 30% da contratilidade voluntária máxima e durante o repouso. Os enantiômeros do carvedilol e metabólitos foram analisados em plasma por LC-MS/MS empregando coluna Chirobiotic® V. O método foi linear no intervalo de 0,05 a 100; 0,05 a 10 e 0,02 a 10 ng/mL para os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol, os desvios do estudo de precisão e exatidão foram inferiores a 15% e não foi observado efeito matriz. A farmacocinética avaliada por modelo não compartimental mostra acúmulo plasmático dos enantiômeros (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol. A disposição cinética e o metabolismo dos enantiômeros do carvedilol não diferem entre os grupos de voluntários não comedicionados e comedicionados com dose única oral de glibenclamida e metformina. No entanto, os valores de AUC de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol [(R)-(+): 6,92 vs 10,40 vs 11,91 ng.h/mL e (S)-(-): 2,36 vs 4,26 vs 3,98 ng.h/mL] são menores no grupo de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 quando comparados ao grupo de voluntários sadios não comedicionados ou comedicionados. Em compensação, os valores de AUC de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol [(R)-(+): 13,89 vs 6,60 vs 4,88 ng.h/mL e (S)-(-): 7,21 vs 1,50 vs 1,45 ng.h/mL] são maiores no grupo de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2. Os parâmetros farmacocinéticos de um paciente metabolizador lento do CYP2D6, portador de diabetes mellitus tipo 2 e em tratamento com glibenclamida e metformina, permite inferir redução na formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol compensada pelo aumento na formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol. Logo, a disposição cinética de ambos os enantiômeros do carvedilol sob a forma inalterada não difere entre metabolizadores rápidos e lentos do CYP2D6. O modelo não linear de efeitos mistos para a análise da disposição cinética e metabolismo populacional dos enantiômeros do carvedilol foi desenvolvido no NONMEM v.7.2 é preciso e possui capacidade preditiva adequada avaliada por métodos visuais do ajuste do modelo aos dados e

bootstrap. Os valores de biodisponibilidade estimados pelo modelo para os enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, respectivamente 16,43 e 25,4%, não diferem entre voluntários saudáveis e pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. Os valores de clearance pelo CYP2D6 estimados para o (S)-(-)-carvedilol foram de 1,65 vs 7,28 L/h, respectivamente, para os voluntários saudáveis e para os pacientes diabéticos, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 2,69 vs 13,7 L/h. Em relação ao clearance pelo CYP2C9, os valores estimados para o (S)-(-)-carvedilol foram de 16,2 vs 7,71 L/h, respectivamente, para os voluntários saudáveis e para os pacientes diabéticos, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 25,6 vs 10,5 L/h. Os valores de clearance por outras vias metabólicas são maiores para o (S)-(-)-carvedilol do que para o (R)-(+)-carvedilol (28,2 vs 4,86 L/h) e não diferem entre voluntários saudáveis e pacientes. Os valores de clearance total de ambos os enantiômeros do carvedilol não diferem entre os voluntários saudáveis e os pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 [(S)-(-): 46,05 vs 43,19 L/h e (R)-(+): 33,15 vs 29,06 L/h], considerando que os menores clearances do CYP2C9 são compensados por maiores clearances do CYP2D6. A variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com o handgrip após a administração de dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico não mostra relação com as concentrações plasmáticas do (S)-(-)-carvedilol.

Palavras chave: 1. Carvedilol; 2. Diabetes *mellitus* tipo 2; 3. Farmacocinética populacional; 4. Enantiômeros; 5. Hidroxifenilcarvedilol; 6. O-desmetilcarvedilol; 7. Glibenclamida; 8. CYP; 9. Cromatografia quiral

Abstract

NARDOTTO, G.H.B. **Pharmacokinetics-pharmacodynamics of carvedilol enantiomers in healthy volunteers and type II diabetes mellitus patients.** 2015. 148f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Carvedilol is an antihypertensive available as racemic mixture, the (S)-(-)-carvedilol is a β and α_1 adrenergic blocker and (R)-(+)-carvedilol is only a α_1 -adrenergic blocker. Carvedilol is metabolized primarily by glucuronidation and by CYP2D6 to hidroxyfenilcarvedilol and CYP2C9 to O-desmetilcarvedilol. This study evaluates the disposition and metabolism of carvedilol, hidroxyphenilcarvedilol and O-desmetilcarvedilol enantiomers in health (n=13) and type II diabetes subjects treated with glibenclamide (5 mg/8h) and in a good glycemic control (n=13) and in a CYP2D6 poor metabolizer diabetes subject (n=1). The subjects received a single racemic carvedilol dose of 25 mg. blood samples were collected until 24h. The heart rate was evaluated during isometric handgrip exercise. Carvedilol and metabolites enantiomers were evaluated in plasma samples by LC-MS/MS. The pharmacokinetics was evaluated by noncompartmental model and higher levels of (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol e (R)-(+)-hidroxyphenilcarvedilol levels are noticed. The carvedilol pharmacokinetics does not change between healthy and type II diabetes subjects. However the AUC values of both O-desmetilcarvedilol enantiomers are lower [(R)-(+): 6,92 vs 10,40 vs 11,91 ng.h/mL e (S)-(-): 2,36 vs 4,26 vs 3,98 ng.h/mL] in the diabetes subjects and the AUC values of both hidroxyphenilcarvedilol enantiomers are higher [(R)-(+): 13,89 vs 6,60 vs 4,88 ng.h/mL e (S)-(-): 7,21 vs 1,50 vs 1,45 ng.h/mL]. It is noticed in CYP2D6 poor metabolizer diabetes subject lower levels of hidroxyphenilcarvedilol but higher of O-desmetilcarvedilol and carvedilol disposition is not changed. A Non-linear mixed effects modelling was performed in NONMEM v.7.2 the model was validated by visual methods and bootstrap. The bioavailability of (S)-(-) and (R)-(+)-carvedilol was 16,43 e 25,4% and no covariate effect was noticed. The CYP2D6 clearance values were 1,65 vs 7,28 L/h to healthy and diabetes subjects, inasmuch (R)-(+)-carvedilol ones were 25,6 vs 10,5 L/h. The CYP2C9 clearance of (S)-(-)-carvedilol were 16,2 vs 7,71 L/h for healthy and diabetes subjects, while (R)-(+)-carvedilol ones were 25,6 vs 10,5 L/h. The (S)-(-)-carvedilol clearance by other metabolic routes are higher (28,2 vs 4,86 L/h) and does not change between healthy and diabetes subjects. Carvedilol total clearance also does not differ between healthy and diabetes subjects because the lower CYP2C9 clearance are balanced by the higher CYP2D6 clearance. The cardiac frequency change induced by handgrip isometric exercise is not related with the (S)-(-)-carvedilol plasma levels.

Keywords: 1. Carvedilol; 2. Type II diabetes *mellitus*; 3. Population pharmacokinetics; 3. Enantiomers; 5. Hidroxyphenilcarvedilol; 6. O-desmetilcarvedilol; 7. Glibenclamide; 8. CYP; 9. Chiral chromatography

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura do carvedilol, com o centro quiral da molécula em destaque.	1
Figura 2 Espectros de massa (m/z) do carvedilol protonado (A1) e seu produto F1 (A2).	12
Figura 3: Espectros de massa (m/z) do hidroxifenilcarvedilol protonado (B1) e seu produto F2 (B2).	13
Figura 4: Espectros de massa (m/z) do O-desmetilcarvedilol protonado (C1) e seu produto F3 (C2).	14
Figura 5: Espectros de massa (m/z) do metoprolol protonado (D1) e seu produto F4 (D2).	15
Figura 6: Cromatogramas referentes a plasma do paciente obtido 1,5 h após a administração de 25 mg de carvedilol racêmico (A1 a A4), plasma enriquecido com 50 e 5 ng/mL de cada enantiômero do carvedilol e O-desmetilcarvedilol, hidroxifenilcarvedilol (B1 a B4) e plasma branco (C1 a C4).	17
Figura 7: Cromatogramas das soluções padrão dos enantiômeros puros (R)-(+)-carvedilol (A1), (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol (B1) e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol (C1). Cromatogramas das soluções padrão racêmicas de carvedilol (A2), O-desmetilcarvedilol (B2) e hidroxifenilcarvedilol (C2).	18
Figura 8: Curvas concentração plasmática vs tempo dos enantiômeros do carvedilol, hidroxicarvedilol e O-desmetilcarvedilol para um paciente portador de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 tratado com 25 mg de carvedilol racêmico.	23
Figura 9: Vias de metabolização oxidativa do carvedilol em microsossomos de fígado humano (Oldham e Clarke, 1997; Tenero <i>et al.</i> , 2000).	35
Figura 10: Gráfico do tamanho da amostra em relação ao poder de teste	37
Figura 11: Curvas concentração plasmática vs tempo para os enantiômeros do carvedilol, hidroxicarvedilol e O-desmetilcarvedilol.	48

Figura 12: Curvas concentração plasmática vs tempo para os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol para os pacientes portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n=13) e voluntários sadios não comedificados (n=13).....	49
Figura 13: Área sob a curva da concentração plasmática vs tempo ($AUC^{0-\infty}$) dos enantiômeros do carvedilol (A) e seus metabólitos (B).	57
Figura 14: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo ($AUC^{0-\infty}$) dos enantiômeros do carvedilol (A) e seus metabólitos (B).	58
Figura 15: (A) Gráfico original do estudo de Neugebauer et al. (1990). Mediana e percentis das concentrações vs tempo após infusão de 12,5 mg de carvedilol racêmico durante 1h. (B) Reprodução dos dados extraídos do estudo de Neugebauer et al. (1990).	69
Figura 16: Esquema do modelo estrutural bicompartimental dos enantiômeros do carvedilol na infusão iv de 12,5 mg do fármaco racêmico durante 1h.....	70
Figura 17: Perfil farmacocinético das concentrações preditas pelo modelo (medianas) e das concentrações observadas (medianas) a partir da infusão iv de 12,5 mg do carvedilol racêmico durante 1h (Neugebauer <i>et al.</i> , 1990).....	71
Figura 18: Verificação Visual Preditiva (VPC) do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol a partir de infusão de 6,25 mg de cada enantiômero do carvedilol durante 1h. (A) escala natural, (B) escala mono-log.	75
Figura 19: Percentis das concentrações dos enantiômeros do carvedilol vs tempo oriundos da simulação da infusão iv de 6,25 mg de cada enantiômero do carvedilol durante 1h (NEUGEBAUER et al., 1990).	76
Figura 20: Esquema do modelo estrutural dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos.	81
Figura 21: <i>Clearance</i> do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9 (A) e <i>Clearance</i> total (B) dos enantiômeros do carvedilol.	86
Figura 22: <i>Clearances</i> por outras vias metabólicas (A) e biodisponibilidade (B) dos enantiômeros do carvedilol.....	87

Figura 23: Volume de distribuição central e periférico dos enantiômeros do carvedilol.	88
Figura 24: Variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício em função das concentrações preditas individuais (A), populacionais (B) e concentração plasmática máxima (C _{max}) individual (C).	89
Figura 25: Gráficos de qualidade do ajuste do modelo (goodness of fit – gof).....	115
Figura 26: Gráficos espelhos (<i>mirror plots</i>) dos enantiômeros do carvedilol.	116
Figura 27: Gráficos espelhos (<i>mirror plots</i>) dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol.	117
Figura 28: Gráficos espelhos (<i>mirror plots</i>) dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol.	118
Figura 29: Verificação visual preditiva (<i>VPC – visual predictive check</i>) dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos.	119
Figura 30: Verificação visual preditiva (<i>VPC – visual predictive check</i>) dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos.	120
Figura 31: PPC dos enantiômeros do carvedilol. Histogramas de frequências das AUC ⁰⁻²⁴ simuladas. Linha: Mediana das AUC ⁰⁻²⁴ observadas.	121
Figura 32: PPC dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol. Histogramas de frequências das AUC ⁰⁻²⁴ simuladas. Linha: Mediana das AUC ⁰⁻²⁴ observadas.	122
Figura 33: PPC dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol. Histogramas de frequências das AUC ⁰⁻²⁴ simuladas. Linha: Mediana das AUC ⁰⁻²⁴ observadas.	123
Figura 34: Análise de NPDE dos enantiômeros do carvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	124
Figura 35: Análise de NPDE dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	125

Figura 36: Análise de NPDE dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	126
---	-----

Lista de tabelas

Tabela 1: Concentrações de cada enantiômero do carvedilol e seus metabólitos nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico.	9
Tabela 2: Resolução enantiomérica (R_s) do carvedilol, O-desmetilcarvedilol e hidroxifenilcarvedilol.	18
Tabela 3: Fator matriz normalizado por padrão interno (FMN) obtido na análise enantiosseletiva do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol adicionados a extratos de plasma branco.	19
Tabela 4: Recuperação dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.	19
Tabela 5: Equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) das curvas de calibração dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.	20
Tabela 6: Precisão e exatidão intra e intercorridas das análises dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.	21
Tabela 7: Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração e pós-processamento dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.	22
Tabela 8: Parametros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em um paciente portador de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 após administração de 25 mg de carvedilol racêmico.	24
Tabela 9: Dados individuais dos voluntários sadios e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina incluídos no estudo ($n=27$) ..	46
Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-carvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação de glibenclamida e metformina e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	50
Tabela 11: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-carvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação de glibenclamida e metformina e portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	51
Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	52

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina	53
Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina	54
Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.	55
Tabela 16: Valores de $AUC^{0-\infty}$ para os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol. Os dados estão apresentados como média geométrica (IC95%).	56
Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos em um paciente portador de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 fenotipado como PM para o CYP2D6.....	58
Tabela 18: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol e variância do erro residual (σ^2) do modelo parcial.	71
Tabela 19: Cálculo da variância associada à variabilidade inter-individual (η) a partir dos dados de administração intravenosa do carvedilol (Neugebauer <i>et al.</i> , 1990). ..	73
Tabela 20: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, variância do erro residual σ^2 e da variabilidade inter-individual ω^2 do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol na administração iv.	74
Tabela 21: Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos, variâncias associadas à variabilidade inter-individual (ω^2) e resultados do <i>bootstrap</i> para o (S)-(-)-carvedilol, (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol.	84
Tabela 22: Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos, variâncias associadas à variabilidade inter-individual (ω^2) e resultados do <i>bootstrap</i> para o (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol.	85
Tabela I: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e avaliação metabólica dos voluntários e pacientes.....	140
Tabela II: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e atividade metabólica dos voluntários e pacientes investigados....	141

Tabela III: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e atividade metabólica dos voluntários e pacientes investigados ...142

Tabela IV: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-carvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0143

Tabela V: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0.....144

Tabela VI: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0.....145

Tabela VII: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-carvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0146

Tabela VIII: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0.....147

Tabela IX: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0.....148

Sumário

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	viii
Sumário	xi
Introdução geral	1
Capítulo 1	3
1. Introdução	4
2. Objetivos	6
3. Casuística e métodos	6
3.1 Análise dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma	6
3.1.1 Soluções padrão	6
3.1.2 Análise cromatográfica	6
3.1.3 Preparo das amostras	7
3.1.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol	8
3.1.5 Validação do método	8
3.2 Casuística e análise farmacocinética	10
4. Resultados	11
5. Discussão	25
6. Conclusão	28
Capítulo 2	29
1. Introdução	30
2. Objetivos	36

3.	Voluntários e protocolo clínico	36
3.1	Parte 1	36
3.2	Parte 2	39
4.	Análise farmacocinética	40
5.	Avaliação do fenótipo do CYP2D6.....	40
6.	Avaliação do fenótipo do CYP3A4.....	42
7.	Avaliação do genótipo do CYP2C9.....	43
8.	Resultados	45
8.1	Avaliação do fenótipo do CYP2D6 e CYP3A4 e genótipo do CYP2C9	45
8.2	Análise farmacocinética dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol, e O-desmetilcarvedilol.	47
8.3	Análise farmacocinética-farmacodinâmica	58
9.	Discussão	59
10.	Conclusão	63
	Capítulo 3.....	65
1.	Introdução	66
2.	Objetivos	67
3.	Casuística e métodos	67
4.	Modelo farmacocinético populacional	68
4.1	Modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol na administração intravenosa.....	68
4.2	Modelo populacional dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos	77
4.3	Avaliação e validação do modelo final	78
4.4	Avaliação farmacocinética - farmacodinâmica	79
5.	Resultados	81
6.	Discussão	90
7.	Conclusão	94

Referências bibliográficas:	96
Anexo	113
Apêndice 1	127
ANEXOS	128
Apêndice 2	139

Introdução geral

O carvedilol, ($\pm$)-1-(carbazol-4-iloxi)-3-[2-(ometoxifenoxi)-etil-amino]-2-propanol, possui um centro quiral (figura 1) e encontra-se disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol. No entanto, os enantiômeros podem interagir de maneira diferente com macromoléculas quirais como proteínas transportadoras, receptores e enzimas, tornando processos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção enantiosseletivos com consequentes diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre os enantiômeros (Honda *et al.*, 2005; Horiuchi *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008).

Figura 1: Estrutura do carvedilol, com o centro quiral da molécula em destaque.

O (S)-(-)-carvedilol é bloqueador α_1 e β -adrenérgico, enquanto o (R)-(+)-carvedilol apresenta apenas a atividade α_1 -bloqueadora (Neugebauer e Neubert, 1991; Giessmann *et al.*, 2004)

O carvedilol é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, atingindo a concentração plasmática máxima (t_{max}) em 0,68 a 3,1 horas. É um fármaco lipofílico de baixa biodisponibilidade oral ($21,5 \pm 6,3\%$), alta ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 98%), volume de distribuição (V_d) variando de 1,1 a 2,9 L/Kg e meia-vida de eliminação de 1,9 a 4,2 horas (Vanmollendorff, Reiff e Neugebauer, 1987; Giessmann *et al.*, 2004). O carvedilol é eliminado principalmente na bile como metabólitos e somente 2% da dose é excretada pelos rins como fármaco inalterado (Gehr *et al.*, 1999). O *clearance* total em voluntários sadios (infusão de 1 h de 12,5 mg de carvedilol racêmico) para o carvedilol como mistura enantiomérica varia entre 375 a 848 mL/min, sendo que o *clearance* do (S)-(-)-carvedilol (662 mL/min) é maior do que o do (R)-(+)-carvedilol (605 mL/min) (Neugebauer *et al.*, 1990). A

biodisponibilidade oral do (R)-(+)-carvedilol é cerca de 2 vezes maior do que a do seu antípoda (31,1% para (R)-(+) e 15,1% para (S)-(-)-carvedilol), sendo as concentrações plasmáticas do (R)-(+)-carvedilol aproximadamente três vezes maiores do que aquelas relatadas para o (S)-(-)-carvedilol. As diferenças observadas na biodisponibilidade dos enantiômeros do carvedilol podem ser atribuídas ao maior *clearance* do (S)-(-)-carvedilol (Neugebauer *et al.*, 1990).

O presente estudo avalia a farmacocinética e a relação farmacocinética e farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. O estudo avalia ainda a disposição cinética enantiosseletiva dos metabólitos 4'-hidroxifenilcarvedilol (4OHC) + 5'-hidroxifenilcarvedilol (5OHC) formados pelo CYP2D6 e O-desmetilcarvedilol (DMC) formado pelo CYP2C9.

O estudo foi dividido em três capítulos. O capítulo 1 aborda o desenvolvimento e a validação do método de análise dos enantiômeros do carvedilol, 4OHC + 5OHC e DMC em plasma com aplicação em estudos de farmacocinética. O capítulo 2 analisa por metodologia não compartimental a farmacocinética dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos em voluntários sadios tratados ou não com glibenclamida e metformina e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. O capítulo 3 relata a análise farmacocinética populacional e a relação farmacocinética - farmacodinâmica nos mesmos voluntários e pacientes por modelo não linear de efeitos mistos.

Capítulo 1

Análise dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma por LC-MS/MS

1. Introdução

O carvedilol, um fármaco disponível na clínica como mistura racêmica, exibe enantiosseletividade na farmacodinâmica, sendo o enantiômero (S)-(-)-carvedilol descrito como bloqueador α_1 e β -adrenérgico, enquanto o (R)-(+)-carvedilol é descrito apenas como bloqueador α_1 (Neugebauer e Neubert, 1991; Giessmann *et al.*, 2004). O carvedilol também exibe enantiosseletividade na farmacocinética com diferenças importantes na biodisponibilidade (31,1% para o (R)-(+) e 15,1% para o (S)-(-)-carvedilol) e no metabolismo com acúmulo plasmático do enantiômero (R)-(+) do fármaco inalterado e de ambos os metabólitos hidroxifenilcarvedilol (formado principalmente pelo CYP2D6) e O-desmetilcarvedilol (formado principalmente pelo CYP2C9) (Vanmollendorff, Reiff e Neugebauer, 1987; Eisenberg, Patterson e Kahn, 1989; Neugebauer *et al.*, 1990; Gehr *et al.*, 1999; Giessmann *et al.*, 2004; Furlong *et al.*, 2012).

A análise sequencial mas não quiral do carvedilol e dos metabólitos 4'-hidroxifenilcarvedilol, 5'-hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma de rato foi descrita apenas por Li e colaboradores (Li *et al.*, 2015) empregando UPLC com detecção MS/MS com relatos de limites de quantificação de 0,05 ng/mL de plasma para o fármaco inalterado e seu metabólitos. A análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol e do metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol foi descrita apenas por Furlong e colaboradores (Furlong *et al.*, 2012) empregando UPLC com detecção MS/MS precedida por reação de derivatização com reagente enantiomericamente puro. Os autores reportam limites de quantificação de 0,2 ng/mL para ambos os enantiômeros do carvedilol e de 0,02 ng/mL para cada enantiômero do metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol. A análise dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol em plasma foi relatada apenas por Eisenberg e colaboradores (Eisenberg, Patterson e Kahn, 1989) empregando HPLC com detecção por fluorescência precedida de derivatização quiral com isotiocianato de d-2,3,4,6-tetra-O-acetil glucopiranosila. Os limites de quantificação descritos pelos autores foram de 0,625 ng/mL de plasma para ambos os enantiômeros do carvedilol e do metabólito O-desmetilcarvedilol. Ressalta-se que a análise dos enantiômeros do 5'-hidroxifenilcarvedilol em coluna de fase quiral foi descrita por Magiera e colaboradores (Magiera, Adolf e Baranowska, 2013) em amostras de urina utilizando a coluna Chiralcel[®] OD-RH acoplada ao sistema HPLC com detecção por fluorescência.

Furlong e colaboradores (Furlong *et al.*, 2012) reportam que os valores de área sob a curva concentração plasmática vs tempo (AUC) para ambos os enantiômeros do metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol em voluntários sadios são aproximadamente 20 vezes menores [5,6 e 2,0 ng.h/mL, respectivamente, para os enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-)] do que aqueles reportados para o carvedilol [136 e 40,7 ng.h/mL, respectivamente, para os enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-)]. No entanto, as concentrações do metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol como mistura enantiomérica (AUC 63,15 ng.h/mL) reportadas por Patel e colaboradores (Patel *et al.*, 2013) foram aproximadamente 4 vezes menores do que aquelas reportadas para o carvedilol (AUC 272,53 ng.h/mL) na investigação de 34 voluntários sadios que receberam dose única oral de carvedilol. Em relação ao metabólito O-desmetilcarvedilol, não há dados de concentrações plasmáticas oriundas da investigação de voluntários sadios ou pacientes tratados com carvedilol.

O presente estudo reporta pela primeira vez o desenvolvimento e a validação de um método de análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol e dos metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol empregando coluna de fase quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS. O método foi aplicado na investigação de um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 tratado com dose única oral de carvedilol racêmico.

2. Objetivos

Desenvolver e validar método de análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma com aplicação em estudos de farmacocinética clínica.

3. Casuística e métodos

3.1 Análise dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma

3.1.1 Soluções padrão

A solução estoque de carvedilol (pureza: 99,1%, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 100 µg/mL de cada enantiômero em metanol (J.T.Backer, pureza: 99,95%, Cidade do México). As soluções estoque de hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol (pureza: 98%, Toronto Research Chemicals - TRC, North York, Canadá) foram preparadas na concentração de 10 µg/mL de cada enantiômero em metanol. A partir das soluções estoque, foram preparadas em metanol 9 soluções padrão nas concentrações de 4000; 2000; 400; 200; 40; 20; 8; 4 e 2 ng/mL de cada enantiômero do carvedilol e de 400; 200; 40; 20; 4; 2; 0,8; 0,4 e 0,2 ng/mL de cada enantiômero do hidroxifenilcarvedilol e do O-desmetilcarvedilol. Estas soluções resultam em concentrações de 100; 50; 10; 5; 1; 0,5; 0,2, 0,1 e 0,05 ng/mL de cada enantiômero do carvedilol em plasma e de 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,02; 0,01 e 0,005 ng/mL de cada enantiômero de hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma após enriquecimento de uma alíquota de 1 mL de plasma branco com 25 µL de cada solução padrão.

A solução padrão de 10 µg/mL de metoprolol racêmico (pureza: 98%, TRC, North York, Canadá) preparada em metanol (J.T.Backer, pureza: 99,95%, , Cidade do México) foi usada como padrão interno (PI) (Poggi *et al.*, 2012).

3.1.2 Análise cromatográfica

As análises foram realizadas em sistema cromatográfico composto de bomba ACQUITY UPLC® H-Class System, injetor automatico ACQUITY UPLC®– FTN e forno de coluna TCM/CHM® (Waters, Milford, Massachusetts, EUA).

Os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol foram separados na coluna Astec Chirobiotic® V (0,46 cm x 25 cm e partículas de 5

μm , Supelco, Bellefonte, EUA) na temperatura de 24 °C com fase móvel constituída de 99% da mistura A e 1% da mistura B na vazão de 0,8 mL/min. A mistura A foi composta por 60% de etanol (Panreac, pureza: 99,9%, Barcelona, Espanha) e 40% de metanol (J.T. Backer, pureza: 99,95%, Cidade do México) com adição de 1,8 mL/L de ácido acético glacial (Synth, pureza: 99,7%, LABSINTH, Diadema/SP) e 0,2 mL/L de dietilamina (J.T. Baker, pureza 100%, Mallinckrot Baker, Phillipsburg, EUA). A mistura B foi composta de água purificada adicionada de 1,8 mL/L de ácido acético e 0,2 mL/L de dietilamina. A água purificada foi obtida no sistema Synergy® UV (Millipore, Molsheim, França).

Os enantiômeros foram analisados no espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQ-S® (Waters, Milford, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por eletronebulização (ESI) Zspray™. As condições de operação foram otimizadas no modo de monitorização de múltiplas reações por infusão direta de solução padrão contendo 80 ng/mL de carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em fase móvel.

A voltagem do capilar foi estabelecida em 3,30 kV e as temperaturas da fonte e de dessolvatação em 150 °C e 550 °C, respectivamente. A energia de colisão foi 15, 20, 22 e 25 V para o metoprolol, O-desmetilcarvedilol, hidroxifenilcarvedilol e carvedilol, respectivamente. A voltagem do cone foi de 50 e 30 V para o metoprolol, e O-desmetilcarvedilol, respectivamente, e de 35 V para o hidroxifenilcarvedilol e carvedilol. O fluxo do gás de dessolvatação e do cone (nitrogênio) foram 1000 e 150 L/h, respectivamente, e o fluxo do gás de colisão (argônio) foi mantido em 0,19 mL/min. O carvedilol, hidroxifenilcarvedilol, O-desmetilcarvedilol e metoprolol protonados e os respectivos produtos foram monitorados nas transições de 407 > 100, 423 > 222, 393 > 210 e 268 > 116, respectivamente.

A aquisição dos dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx, versão 4,1 (Waters, Milford, Massachusetts, US). As equações de regressão linear foram obtidas a partir das razões área do analito/ área do PI, plotadas contra as respectivas concentrações nominais dos padrões de cada enantiômero do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol.

3.1.3 Preparo das amostras

As amostras de plasma foram preparadas por extração líquido-líquido com éter di-isopropílico como segue. Alíquotas de 1 mL de plasma foram adicionadas de 25 μL

da solução do PI (metoprolol 10 µg/mL) e 5 mL de éter di-isopropílico (pureza 98,5%, Sigma-Aldrich, Spruce Street, St. Louis, MO, EUA) (Poggi *et al.*, 2012). As amostras foram agitadas durante 50 min em agitador mecânico horizontal a 220 ± 10 ciclos/min (MA 139/CFT, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e centrifugadas a 1800g durante 10 min a 5°C em centrifuga refrigerada (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão). Volumes de 4 mL da fase orgânica foram separados e evaporados à secura em evaporador à vácuo (Christ RVC 2-25 CD e Christ CT 04-50 SR, Osterode am Harz, Alemanha). Os resíduos foram reconstituídos em 100 µL da mistura A e 70 µL foram injetados na coluna Chirobiotic® V. As amostras processadas foram mantidas no injetor automático a 12 °C.

3.1.4 Determinação da ordem de eluição dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol

Alíquotas de 25 µL das soluções padrão de (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol (pureza: 98%, TRC, North York, Canadá) nas concentrações de 2, 4 e 3 µg/mL de metanol, respectivamente, foram evaporadas à secura e submetidas à análise cromatográfica. Os tempos de retenção foram comparados com os obtidos na análise das soluções dos padrões racêmicos em metanol.

3.1.5 Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com as recomendações da resolução para métodos bioanalíticos vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA, Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 (Anvisa, 2012).

As curvas de calibração foram preparadas em triplicata empregando alíquotas de 1 mL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de carvedilol e seus metabólitos, incluindo amostra branco e amostra zero. As curvas de calibração foram construídas no intervalo de 0,05 a 100 ng de cada enantiômero do carvedilol; 0,05 a 10 ng de cada enantiômero do hidroxifenilcarvedilol e de 0,02 a 10 ng de cada enantiômero do O-desmetilcarvedilol por mL de plasma.

Foram preparadas as seguintes amostras de controle de qualidade em plasma branco: limite inferior de quantificação (CQLIQ), baixa (CQB), média (CQM), alta (CQA) e de diluição (CQD). As amostras de controle de qualidade nas concentrações apresentadas na tabela 1 foram armazenadas a -70 °C.

Tabela 1: Concentrações de cada enantiômero do carvedilol e seus metabólitos nos controles de qualidade utilizados na validação do método analítico.

Amostra (ng/mL)	Carvedilol (cada enantiômero)	Hidroxifenilcarvedilol (cada enantiômero)	O-desmetilcarvedilol (cada enantiômero)
CQLIQ	0,05	0,05	0,02
CQB	0,08	0,08	0,04
CQM	4	0,4	0,4
CQA	80	8	8
CQD*	400	40	40

*CQD: as amostras foram diluídas em plasma branco na proporção de 1/5 imediatamente antes do preparo da amostra.

A seletividade foi determinada empregando alíquotas de 1 mL de plasma branco obtidas de seis diferentes voluntários, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. Os cromatogramas obtidos foram comparados com as amostras de CQLIQ.

Para a avaliação do efeito residual, foram analisadas injeções da amostra branco antes e após a injeção da amostra do limite superior de quantificação (LSQ). O cromatograma da amostra branco obtido após a injeção do LSQ foi comparado com o da amostra do CQLIQ.

O efeito matriz foi avaliado empregando 8 alíquotas de 1 mL de plasma branco obtido de diferentes voluntários, sendo 2 lipêmicas, 2 hemolisadas e 4 normais. Os extratos de plasma branco obtidos foram enriquecidos com soluções padrão nas concentrações equivalentes ao CQA e CQB e com a solução de PI. Também foram analisadas as mesmas soluções padrão em metanol adicionadas da solução de PI. Para cada amostra foi calculado o fator matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação abaixo. O efeito matriz foi avaliado como o coeficiente de variação (CV%) de todos os FMN obtidos.

$$FMN = \frac{\text{área do analito em matriz} / \text{área do padrão interno em matriz}}{\text{área do analito em solução} / \text{área do padrão interno em solução}}$$

A eficiência do processo de extração foi avaliada em 8 alíquotas de 1 mL de plasma branco (2 lipêmicas, 2 hemolisadas e 4 normais) enriquecidas com soluções padrão contendo carvedilol e metabólitos nas concentrações equivalentes ao CQA e CQB. Os resultados foram comparados com os obtidos na análise das mesmas soluções padrão em metanol enriquecidas com PI. A porcentagem de recuperação foi determinada de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{\text{área do analito extraído} / \text{área do padrão interno extraído}}{\text{área do analito em metanol} / \text{área do padrão interno em metanol}} \right) \cdot 100$$

A precisão e exatidão foram determinadas empregando 6 replicatas de CQLIQ, CQB, CQM, CQA e CQD analisadas em uma única corrida analítica (intracorrida) e em 3 corridas analíticas distintas (intercorridas). Os resultados de precisão e exatidão foram apresentados como coeficiente de variação (CV%) e erro padrão relativo (EPR%).

$$\text{EPR\%} = \left(\frac{\text{concentração média experimental} - \text{concentração nominal}}{\text{concentração experimental}} \right) \cdot 100$$

Os testes para a avaliação da estabilidade em matriz biológica foram conduzidos com quatro replicatas de CQB e CQA. Na avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as replicatas de CQA e CQB foram congeladas a -70 °C durante 24 h e, posteriormente, descongeladas à temperatura ambiente e congeladas novamente a -70 °C por 24 h, sendo este ciclo repetido por mais duas vezes. As amostras foram analisadas ao final dos 3 ciclos. Na estabilidade de curta duração as amostras de CQB e CQA permaneceram em temperatura ambiente por 1 h antes de serem preparadas e analisadas. Na estabilidade de pós-processamento, as amostras processadas de CQB e CQA permaneceram armazenadas no injetor automático a 12°C durante 24 h antes da análise. Os resultados foram expressos como CV% e EPR%.

3.2 Casuística e análise farmacocinética

O estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FCFRP nº 219) em 30 de junho de 2011 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em 15 de julho de 2011 (apêndice I). O paciente permaneceu livre para recusar a participação no estudo ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi investigado um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2, de 48 anos e com função hepática e função renal dentro dos parâmetros da normalidade selecionado no Centro de Saúde Escola da FMRP-USP.

O paciente recebeu, em jejum de 12 horas, um comprimido de 25 mg de carvedilol racêmico (Carvedilat®, EMS, Hortolândia, SP) com 200 mL de água. O café da manhã foi servido 3 h após a administração do fármaco. As amostras seriadas de sangue (volumes aproximados de 5 mL) foram coletadas nos tempos zero, 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 15; 18 e 24 h após a administração do fármaco. Após centrifugação durante 10 min a 2500 rpm (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão), as amostras de plasma foram separadas e armazenadas à -70 °C até o momento da análise.

As amostras de plasma do paciente investigado e as amostras dos controles de qualidade foram analisadas empregando curvas de calibração preparadas em duplicata. As curvas de calibração foram aceitas de acordo com os critérios da Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 (Anvisa, 2012).

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol foram calculados empregando o programa WinNonLin versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA).

4. Resultados

Os íons protonados e seus respectivos produtos obtidos na análise do carvedilol (406,8>100), hidroxifenilcarvedilol (423,0>222), O-desmetilcarvedilol (393,2>210) e metoprolol (PI, 268>116) estão apresentados nas figuras 2 a 5. Os íons produtos foram selecionados com base na intensidade do sinal e na separação de outros metabólitos hidroxilados do carvedilol, tais como 1, 3 e 8-hidroxicarbazolilcarvedilol (Furlong *et al.*, 2012).

Figura 2 Espectros de massa (m/z) do carvedilol protonado (A1) e seu produto F1 (A2).

Figura 3: Espectros de massa (m/z) do hidroxifenilcarvedilol protonado (B1) e seu produto F2 (B2).

Figura 4: Espectros de massa (m/z) do O-desmetilcarvedilol protonado (C1) e seu produto F3 (C2).

Figura 5: Espectros de massa (m/z) do metoprolol protonado (D1) e seu produto F4 (D2).

A figura 6 apresenta os cromatogramas obtidos na análise dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma empregando a coluna Chirobiotic® V e fase móvel constituída por 99% da mistura A e 1% da mistura B. Pode-se verificar que nas amostras branco não há interferentes eluindo juntamente com os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol, O-desmetilcarvedilol ou padrão interno.

Figura 6: Cromatogramas referentes a plasma do paciente obtido 1,5 h após a administração de 25 mg de carvedilol racêmico (**A1** a **A4**), plasma enriquecido com 50 e 5 ng/mL de cada enantiômero do carvedilol e O-desmetilcarvedilol, hidroxifenilcarvedilol (**B1** a **B4**) e plasma branco (**C1** a **C4**).

Picos: 1: (S)-(-)-carvedilol, 2: (R)-(+)-carvedilol, 3: (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol, 4: (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol, 5: (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol, 6: (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol, 7: metoprolol (PI).

A tabela 2 apresenta o cálculo da resolução dos picos cromatográficos dos enantiômeros do carvedilol, O-desmetilcarvedilol e hidroxifenilcarvedilol.

Tabela 2: Resolução enantiomérica (R_s) do carvedilol, O-desmetilcarvedilol e hidroxifenilcarvedilol.

	carvedilol	O-desmetilcarvedilol	hidroxifenilcarvedilol
R_s	1,07	1,07	0,8

$R_s = 2 \cdot (dr_2 - dr_1) / (wb_2 + wb_1)$, onde $dr_2 - dr_1$ representa a distância entre os picos (cm) e wb_1 e wb_2 representam as larguras dos picos 1 e 2 (cm).

A ordem de eluição dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol está apresentada na figura 7 através dos tempos de retenção dos enantiômeros puros (R)-(+), referentes ao carvedilol e seus metabólitos. Os dados permitem inferir que os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol são eluídos na sequência (S)-(-) e (R)-(+).

Figura 7: Cromatogramas das soluções padrão dos enantiômeros puros (R)-(+)-carvedilol (A1), (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol (B1) e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol (C1). Cromatogramas das soluções padrão racêmicas de carvedilol (A2), O-desmetilcarvedilol (B2) e hidroxifenilcarvedilol (C2).

As tabelas 3 e 4 mostram, respectivamente, os cálculos do fator matriz normalizado por padrão interno (FMN) e da recuperação para os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos. Os dados estão apresentados como média e CV%.

Tabela 3: Fator matriz normalizado por padrão interno (FMN) obtido na análise enantiosseletiva do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol adicionados a extratos de plasma branco.

Fármacos	FMN	CV%
(R)-(+)-carvedilol	0,98	5,05
(S)-(-)-carvedilol	0,95	3,65
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol	1,04	13,60
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol	1,01	11,48
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol	1,02	13,85
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol	1,01	3,14

Os dados estão apresentados como média do FMN e CV%.

Tabela 4: Recuperação dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.

Fármacos	CQB (%)		CQA (%)	
	Recuperação (CV)		Recuperação (CV)	
(R)-(+)-carvedilol	95,30	(3,14)	98,05	(5,60)
(S)-(-)-carvedilol	90,68	(13,29)	96,75	(8,43)
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol	83,70	(12,50)	87,54	(13,29)
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol	87,29	(8,71)	92,18	(12,12)
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol	95,52	(13,50)	94,43	(6,25)
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol	97,85	(9,16)	98,11	(5,11)

CQB: Amostras de controle de qualidade de baixa concentração e CQA: Amostras de controle de qualidade de alta concentração

A tabela 5 mostra as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) das curvas de calibração dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos. Os coeficientes de determinação (r^2) foram maiores que 0,98 para todas as curvas de calibração.

Tabela 5: Equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) das curvas de calibração dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.

Fármacos	Linearidade	Equação	r	r^2
(R)-(+)-carvedilol	0,05 -100	$0,3608 \times +0,0180$	0,9977	0,9955
(S)-(-)-carvedilol	0,05 -100	$0,2658 \times +0,0042$	0,9996	0,9991
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol	0,05 -10	$0,1483 \times +0,0153$	0,9977	0,9955
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol	0,05 -10	$0,1068 \times +0,0023$	0,9996	0,9991
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol	0,02-10	$0,3174 \times -0,0190$	0,9997	0,9986
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol	0,02-10	$0,2299 \times +0,0126$	0,9932	0,9865

r: coeficiente de correlação. r^2 coeficiente de determinação.

A precisão e a exatidão intracorrída e intercorrídas foram avaliadas pelo coeficiente de variação (CV%) e erro padrão relativo (EPR%) de 6 replicatas de amostras de CQLIQ, CQB, CQM, CQA e CQD analisadas em uma única corrida analítica (intracorrída) e em três corridas distintas (intercorrídas). Todos os valores de CV% e EPR% foram inferiores a 15% (tabela 6).

Tabela 6: Precisão e exatidão intra e intercorridas das análises dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.

Intracorrida						Intercorridas				
	CQLIQ	CQB	CQM	CQA	CQD	CQLIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
(R)-(+)-carvedilol										
CV%	4,87	2,37	6,82	1,02	0,67	4,95	2,75	6,04	1,23	1,02
EPR%	1,20	1,50	1,53	0,13	0,55	1,07	1,44	0,16	0,14	0,12
(S)-(-)-carvedilol										
CV%	4,33	1,57	3,91	0,45	0,49	4,84	4,40	5,92	0,66	1,05
EPR%	1,20	2,50	4,85	0,79	1,68	0,53	0,37	1,05	0,37	0,66
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol										
CV%	8,14	1,02	6,04	3,58	4,69	6,82	3,00	6,12	3,12	3,36
EPR%	0,40	2,25	3,75	2,60	1,88	1,80	1,25	0,46	0,57	0,20
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol										
CV%	5,57	4,56	10,0	4,40	3,45	4,55	3,83	7,57	4,28	3,28
EPR%	0,40	1,50	4,20	1,80	0,82	1,80	0,31	1,72	0,50	0,61
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol										
CV%	13,7	1,32	3,53	3,09	4,51	14,3	4,76	5,90	2,88	3,48
EPR%	4,00	3,50	0,55	0,96	2,45	1,00	0,62	0,21	0,65	1,56
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol										
CV%	13,2	5,26	7,98	3,01	3,65	9,87	4,53	5,13	3,38	3,21
EPR%	2,00	3,00	2,50	1,44	1,61	1,50	1,62	1,40	0,17	0,99

CV%: coeficiente de variação. EPR%: erro padrão relativo. CQLIQ, CQB, CQM, CQA, CQD: Controles de qualidade: limite inferior de quantificação, baixo, médio, alto e de diluição (diluição 1/5).

A estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração e pós-processamento, avaliada com 4 replicatas de amostras CQB e CQA, está apresentada na tabela 7.

Tabela 7: Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, curta duração e pós-processamento dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma.

Fármacos	ciclos congelamento descongelamento (-70 a 24°C)		curta duração (após 1 h a 24°C)		pós-processamento (24 h a 12 °C)	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
(R)-(+)-carvedilol						
EPR%	1,25	0,23	2,50	4,10	0,25	0,46
CV%	3,27	1,29	8,54	5,22	2,84	1,09
(S)-(-)-carvedilol						
EPR%	1,25	0,60	6,67	5,09	3,00	0,17
CV%	2,14	0,58	2,44	1,27	6,35	3,67
(R)-(+)-OHC						
EPR%	2,50	0,69	2,50	0,63	0,25	1,48
CV%	1,28	4,09	3,66	4,24	3,88	3,62
(S)-(-)-OHC						
EPR%	1,67	1,69	0,42	3,03	2,75	0,86
CV%	3,88	3,21	2,61	3,99	3,45	5,22
(R)-(+)-DMC						
EPR%	8,33	0,70	4,17	1,95	0,02	0,30
CV%	4,17	0,94	7,71	6,31	4,68	3,76
(S)-(-)-DMC						
EPR%	6,67	0,17	4,17	0,12	1,00	1,13
CV%	4,09	1,18	7,33	6,00	5,70	4,62

Os dados estão apresentados como EPR em relação às concentrações nominais e CV. EPR%: erro padrão relativo. CV%: coeficiente de variação. CQB e CQA: Controle de qualidade de baixa e alta concentrações. OHC: hidroxifenilcarvedilol. DMC: O-desmetilcarvedilol

O método de análise dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma foi aplicado em estudo de disposição cinética e metabolismo em um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 tratado com dose única oral de 25 mg do fármaco racêmico.

As curvas concentração plasmática vs tempo para cada enantiômero estão apresentados na figura 8, enquanto os parâmetros farmacocinéticos estão apresentados na tabela 8.

Figura 8: Curvas concentração plasmática vs tempo dos enantiômeros do carvedilol, hidroxicarvedilol e O-desmetilcarvedilol para um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 tratado com 25 mg de carvedilol racêmico.

Tabela 8: Parametros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, hidroxicarvedilol e O-desmetilcarvedilol em um paciente portador de diabetes mellitus tipo 2 após administração de 25 mg de carvedilol racêmico.

Parâmetro	(R)-(+)-carvedilol	(S)-(-)-carvedilol	(R)-(+)-OHC	(S)-(-)-OHC	(R)-(+)-DMC	(S)-(-)-DMC
AUC (ng.h/mL)	132,69	46,18	12,57	7,09	26,96	9,21
CL/F (L/h)	94,21	270,69	---	---	---	---
V1/F (L)	311,16	399,69	---	---	---	---
V2/F (L)	417,03	1164,67	---	---	---	---
T1/2 (h)	6,75	5,18	6,52	11,92	6,75	4,05
Tmax (h)	0,94	0,89	0,65	1,08	1,14	1,09
Cmax (ng/mL)	29,08	14,51	3,91	1,13	3,19	1,36
AUC (R) / (S)	2,87		1,77		2,93	

OHC: hidroxicarvedilol. DMC: O-desmetilcarvedilol: AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo de zero ao infinito. CL/F: *Clearance* total aparente. V1/F: Volume de distribuição central aparente. V2/F: Volume de distribuição periférico aparente. T1/2: meia- vida de eliminação, Cmax: concentração plasmática máxima e Tmax: Tempo para atingir a Cmax. AUC (R) / (S): Razão enantiomérica de AUC.

5. Discussão

No presente capítulo está apresentado o método de análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma empregando extração líquido-líquido, coluna quiral e espectrometria de massas, o qual foi aplicado em estudo de disposição cinética e metabolismo do carvedilol em um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 após dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico.

Diversos métodos descrevem a análise enantiosseletiva do carvedilol inalterado em plasma e urina após derivatização com reagentes enantiomericamente puros ou utilizando colunas quirais com detecção por fluorescência ou espectrometria de massas (Yang *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2006; Peccinini *et al.*, 2008; Zakrzewski-Jakubiak *et al.*, 2010; Poggi *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014). Outros métodos descrevem apenas a análise quiral do carvedilol e hidroxifenilcarvedilol ou carvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma ou urina (Eisenberg, Patterson e Kahn, 1989; Furlong *et al.*, 2012; Magiera, Adolf e Baranowska, 2013). Eisenberg *et al.* (1989) descrevem o uso da reação de derivatização com reagente quiral (isotiocianato de d-2,3,4,6-tetra-O-acetil glucopiranosila) e detecção por fluorescência para a análise carvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma com relatos de limites inferiores de quantificação de 0,625 ng/mL para ambos os enantiômeros do fármaco inalterado e seu metabólito. A mesma reação de derivatização com reagente quiral foi descrita por Furlong *et al.* (2012) utilizando detecção por LC-MS/MS com relatos de limites inferiores de quantificação de 0,2 ng/mL de plasma para os enantiômeros do carvedilol e 0,02 ng/mL de plasma para os enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol. O método descrito por Magiera *et al.* (2013) emprega coluna quiral (Chiralcel® OD-RH) com detecção por fluorescência e relata limites inferiores de quantificação de 25 ng/mL de urina para os enantiômeros do carvedilol e hidroxifenilcarvedilol.

O presente estudo descreve pela primeira vez a análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol e dos metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma utilizando coluna quiral acoplada ao sistema LC-MS/MS. No presente estudo, a coluna quiral Chirobiotic V® não separou o metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol do metabólito 5'-hidroxifenilcarvedilol, os quais também não foram separados no detector MS/MS por diferirem apenas na posição da hidroxila no anel fenólico (Furlong *et al.*, 2012). Logo, no presente estudo o método foi validado

empregando apenas o padrão 4'-hidroxifenilcarvedilol, embora as concentrações nas amostras de plasma do paciente investigado referem-se à soma das concentrações dos metabólitos 4'-hidroxifenilcarvedilol e 5'-hidroxifenilcarvedilol, sendo reportadas apenas como hidroxifenilcarvedilol.

O tempo de corrida cromatográfica empregando a coluna quiral Chirobiotic V[®] foi de 26 min (figura 6) e a resolução enantiomérica foi de 1,07 para o carvedilol e O-desmetilcarvedilol e de 0,8 para o hidroxifenilcarvedilol (tabela 2). De acordo com Collins e colaboradores (Collins, Braga e Bonato, 2006), picos com resolução de até 0,8 podem ser quantificados quando as razões de concentração dos picos são de até 1:4. Ressalta-se que a resolução dos picos do hidroxifenilcarvedilol foi de 0,8 (tabela 2) e que as razões enantioméricas de AUC deste metabólito foram de aproximadamente 1:2 (tabela 8).

A análise de diferentes amostras de plasma branco (figura 6) não evidencia interferência dos componentes endógenos com os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos, indicando adequada seletividade. Os coeficientes de variação obtidos para todos os valores de FMN foram menores que 15% (tabela 3), indicando ausência de efeito matriz. A amostra de plasma branco analisada imediatamente após a amostra de LSQ não apresentou interferentes, indicando que não há efeito residual de injeções anteriores.

Os valores de recuperação após a extração com éter di-isopropílico em meio neutro foram maiores que 80% (CV<14%) para ambos os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos e independentes das concentrações analisadas (tabela 4). Os valores de recuperação obtidos no presente estudo são próximos aos valores relatados por Poggi et al. (2012). Recuperações de aproximadamente 65% para ambos os enantiômeros do carvedilol foram relatadas por Saito et al. (2006) empregando éter dietílico como solvente extrator e por Jiang et al. (2014) empregando éter metil-tert-butílico. Furlong et al. (2012) relatam recuperações de 80-90% para ambos os enantiômeros do carvedilol e hidroxifenilcarvedilol empregando SLE (*supported liquid extraction*).

Considerando que as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol são aproximadamente 10 vezes menores do que dos enantiômeros do carvedilol (Eisenberg, Patterson e Kahn, 1989; Gehr et al., 1999; Tenero et al., 2000; Furlong et al., 2012), baixos valores de limites inferiores de quantificação são fundamentais para a aplicação do método em estudo clínicos de

disposição cinética e metabolismo de dose única do fármaco racêmico. O método desenvolvido e validado no presente estudo apresenta limites inferiores de quantificação de 0,05 ng/mL para ambos os enantiômeros do carvedilol e hidroxifenilcarvedilol e 0,02 ng/mL para ambos os enantiômeros do O-desmetilcarvedilol (tabela 5). Logo, o presente método é mais sensível do aqueles reportados por Eisenberg et al. (1989) e por Furlong et al. (2012). O método permitiu quantificar os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol até 24 h após a administração de dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico (figura 8).

Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erro padrão da média menores que 15% (tabela 6) indicando o método como preciso e exato. Os estudos de estabilidade apresentados na tabela 7 mostram coeficientes de variação menores que 15% garantindo a estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, 1 h na bancada à temperatura ambiente e 24h após o processamento (amostras mantidas a 12 °C).

O método desenvolvido e validado foi aplicado na investigação da enantiosseletividade na disposição cinética do carvedilol e seus metabólitos em um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2. Os dados apresentados na tabela 8 permitem inferir acúmulo plasmático do enantiômero (R)-(+)-carvedilol com observação de valores de aproximadamente 2 vezes maiores para o C_{max} (concentração plasmática máxima) e 3 vezes maiores para AUC (área sob a curva concentração plasmática vs tempo) quando comparado ao seu antípoda. O *clearance* aparente e o volume de distribuição aparente do (S)-(-)-carvedilol também foram aproximadamente 3 vezes maiores quando comparado ao enantiômero (R)-(+). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para ambos os enantiômeros do carvedilol para o paciente investigado portador de diabetes *mellitus* tipo 2 estão de acordo com dados anteriores da literatura para voluntários sadios ou pacientes hipertensos (Neugebauer et al., 1990; Gehr et al., 1999; Tenero et al., 2000; Tenero et al., 2006; Saito et al., 2010; Furlong et al., 2012).

Os dados também permitem inferir acúmulo plasmático do enantiômero (R)-(+)-dos metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol (figura 8 e tabela 8). O valor de AUC do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol para o paciente investigado é aproximadamente o dobro daquele observado para o enantiômero (S)-(-). O acúmulo plasmático do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol também foi descrito por Furlong et al.

(2012) na investigação de voluntários sadios. Observa-se ainda que o valor de AUC do metabólito (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol é aproximadamente o triplo daquele observado para o enantiômero (S)-(-). A análise dos enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol foi descrita apenas por Eisenberg et al. (1989) com observação de menores concentrações plasmáticas do enantiômero (S)-(-).

6. Conclusão

O método desenvolvido e validado de análise sequencial dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma empregando coluna quiral e LC-MS/MS apresenta sensibilidade, linearidade, seletividade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudo de farmacocinética clínica de dose única oral do fármaco racêmico. Ressalta-se, no entanto, que o método apresenta a limitação de não separar o metabólito 4'-hidroxifenilcarvedilol do metabólito 5'-hidroxifenilcarvedilol.

Capítulo 2

Farmacocinética dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos em voluntários saudáveis e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

1. Introdução

O diabetes *mellitus* e a hipertensão são doenças comuns que coexistem a frequência maior do que apenas o acaso poderia determinar, pois 40 a 75% dos pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 são também hipertensos (Epstein e Sowers, 1992; Sowers, Epstein e Frohlich, 2001; Bell, Bakris e McGill, 2009). Cerca de 5% da população brasileira é portadora de diabetes, sendo 3,3% portadora de diabetes e hipertensão (Freitas e Garcia, 2012). A presença de hipertensão em pacientes diabéticos aumenta a morbidade e a mortalidade considerando que 35 a 75% das complicações do diabetes *mellitus* podem ser atribuídas a hipertensão. O desenvolvimento de doenças vasculares, episódios de ataques cardíacos e isquemia do miocárdio são maiores em pacientes diabéticos e hipertensos do que em pacientes diabéticos normotensos, assim como as causas de morte por causas cardiovasculares (Epstein e Sowers, 1992; Sowers, Epstein e Frohlich, 2001; Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012).

Os β -bloqueadores são de grande importância no controle da pressão arterial, na redução da mortalidade cardiovascular na doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca congestiva e na proteção cardíaca após o infarto agudo do miocárdio (Poole-Wilson *et al.*, 2003; Torp-Pedersen *et al.*, 2007; Ayers *et al.*, 2012). No entanto, estudos clínicos reportam que as primeiras gerações de β -bloqueadores administradas a pacientes hipertensos resultam em aumento da resistência à insulina com consequente desenvolvimento de diabetes em 25 a 30% dos pacientes hipertensos tratados (Gress *et al.*, 2000; Dahlof *et al.*, 2005; Bell, Bakris e McGill, 2009), assim como em pacientes diabéticos na elevação da glicemia de jejum em 1,55 mmol/L e hemoglobina glicada em 1%, redução do HDL e aumento de LDL e triglicérides (Dornhorst, Powell e Pensky, 1985; Holzgreve *et al.*, 2003; Bakris *et al.*, 2004). Logo, a prescrição das primeiras gerações de β -bloqueadores não é recomendada para pacientes resistentes a insulina (pré-diabéticos) ou pacientes diabéticos (Faria *et al.*, 2002; Bell, Bakris e McGill, 2009; Freitas e Garcia, 2012).

O carvedilol (um β -bloqueador de terceira geração) é um inibidor β adrenérgico não seletivo e inibidor α_1 adrenérgico, usado no tratamento da hipertensão, angina do peito, arritmias cardíacas e insuficiência cardíaca congestiva (Honda *et al.*, 2005; Horiuchi *et al.*, 2008; Ishida *et al.*, 2008) não aumenta a resistência a insulina, não altera o controle glicêmico (Jacob *et al.*, 1996; Bakris *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2007)

e não aumenta o LDL e triglicérides (Giugliano *et al.*, 1997; Bell, Bakris e McGill, 2009). Logo, a indução de diabetes é significativamente menos provável no tratamento com carvedilol do que com β -bloqueadores de gerações anteriores como o metoprolol (Poole-Wilson *et al.*, 2003; Torp-Pedersen *et al.*, 2007).

O uso do carvedilol em pacientes portadores de hipertensão e diabetes é portanto de grande potencial, mas pouco explorado na prática clínica (Allcock e Sowers, 2010) não apenas devido a relutância do uso de β -bloqueadores em pacientes diabéticos mas também por se saber muito pouco sobre a influência do diabetes *mellitus* na sua farmacocinética e farmacodinâmica (Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012).

Embora o efeito do diabetes *mellitus* no metabolismo de medicamentos seja bastante relatado em modelos animais quimicamente induzidos e em modelos *in-vitro*, há poucos dados clínicos sobre a influência do diabetes na farmacocinética e farmacodinâmica em pacientes com glicemia controlada ou hiperglicemia (Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012). Assim, um dos objetivos do presente estudo é acrescentar informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica do carvedilol em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

O diabetes *mellitus* pode alterar os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos. A literatura relata diferentes efeitos do diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2 na velocidade da absorção de medicamentos em função de alterações nos tempos de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal. Vários estudos relatam retardo no tempo de esvaziamento gástrico em pacientes com hiperglicemia e retardo no tempo de trânsito intestinal em pacientes diabéticos com neuropatia, provavelmente devido a desnervação vagal (Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012). A velocidade de absorção da tolazamida e ampicilina é reduzida em aproximadamente 26% em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (Adithan *et al.*, 1989). Quanto a influência na distribuição de fármacos, há vários relatos de que a hiperglicemia resulta na glicação não enzimática da albumina com consequente alteração na conformação da estrutura da albumina e aumento na fração livre de fármacos, tais como lidocaína, varfarina, ácido valpróico, entre outros (Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012), mas a influência deste efeito no volume de distribuição não é clara pois no diabetes *mellitus* o volume de distribuição pode estar maior, menor ou inalterado (Salmela, Sotaniemi e Pelkonen, 1980; Murali *et al.*, 1983;

Narang, Dutta e Khare, 1987; Adithan *et al.*, 1988; Zysset e Wietholtz, 1988). Os estudos clínicos da influência do diabetes no metabolismo de medicamentos são escassos. Há relatos de que os valores de *clearance* da teofilina ou cafeína (marcador da atividade do CYP1A2) e que o metabolismo da tolbutamida (marcador da atividade do CYP2C9) não são alterados em pacientes com diabetes *mellitus* tipo I ou tipo 2 (Ueda *et al.*, 1963; Adithan *et al.*, 1988), mas que a atividade do CYP3A avaliada com base no marcador lidocaina encontra-se reduzida nos referidos pacientes (Marques *et al.*, 2002). Outros estudos ainda mostram redução na atividade da GST e UGT2B7 em pacientes com diabetes *mellitus* tipo I e outro indução (Atalay *et al.*, 1997; Mcrobie, Glover e Tracy, 1998; Dincer *et al.*, 2002). Os estudos clínicos relativos aos efeitos do diabetes na expressão gênica e níveis proteicos de transportadores são muito limitados. Relata-se redução na expressão proteica de ABCA1 e ABCG1 em leucócitos correlacionada com os níveis de glicemia em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (Albrecht *et al.*, 2004; Mauldin *et al.*, 2008).

O carvedilol é substrato das proteínas transportadoras P-gp e MRP2 localizadas nas células com função de barreira, tais como mucosa intestinal, barreira hematoencefálica e placenta, assim como nas células envolvidas em processos de eliminação, como canalículos hepático e células do túbulo proximal dos rins (Takara, Sakaeda e Okumura, 2004; Bart *et al.*, 2005). Giessmann *et al.*, 2004 relatam significativa redução na área sob a curva concentração plasmática ao longo do tempo (AUC) do carvedilol (25 mg por dia) em voluntários sadios (metabolizadores rápidos e metabolizadores lentos do CYP2D6) comedicionados com rifampicina (600 mg) durante 9 dias. Os autores justificam as alterações nos parâmetros farmacocinéticos como decorrentes da indução da P-gp intestinal mediada pela rifampicina, no entanto, sabe-se que a rifampicina induz não apenas a expressão da P-gp, mas também a atividade de isoformas da glicuronosiltransferase (UGT), CYP e MPR2 (Kasichayanula *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Devineni *et al.*, 2015).

A glibenclamida, uma sulfoniluréia amplamente usada na terapia do diabetes *mellitus* tipo 2, é substrato do CYP2C9, potente inibidor competitivo do CYP2C9 e fraco inibidor do CYP3A4 (Kim e Park, 2003; Tirkkonen *et al.*, 2010; Surendiran *et al.*, 2011; Holstein, Beil e Kovacs, 2012). A glibenclamida também é considerada um inibidor da P-gp. Golstein e Bessadok (Golstein *et al.*, 1999; Bessadok *et al.*, 2011) mostraram que em concentrações $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ a glibenclamida inibe o transporte de

colchicina pela P-gp em culturas de células derivadas de leucemia humana aguda que super expressam a P-gp, em culturas de células derivadas de carcinoma de cólon que super expressam a P-gp e em culturas de células não tumorais derivadas do epitélio tubular proximal renal que expressam a P-gp constitutivamente.

Além da inibição da atividade transportadora da P-gp, a inibição da expressão da P-gp também acumula seus substratos (Kim *et al.*, 2011). Células MCF-7/adriamicina tratadas com metformina, uma biguanida muito usada no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2, apresentam menor expressão de mRNA e de proteínas do gene MDR1. Conseqüentemente, células MCF-7/adriamicina pré-tratadas com metformina apresentaram acúmulo intracelular do Rh-123, um composto fluorescente substrato da P-gp (Kim *et al.*, 2011).

A hiperglicemia também inibe a expressão da P-gp em células MCF-7 (Pandey, Chaube e Bhat, 2011), no intestino (Nawa, Fujita e Tokuyama, 2010) e no íleo (Nawa, Fujita-Hamabe e Tokuyama, 2011) de camundongos e nos rins de ratos (Yeh *et al.*, 2012).

O carvedilol é eliminado principalmente por conjugação com o ácido glicurônico (UGT1A1, UGT2B4 e UGT2B7) seguida por excreção biliar dos conjugados (Neugebauer e Neubert, 1991; Ohno *et al.*, 2004). Estudos em microsossomos de fígado e intestino humano mostram que o *clearance* intrínseco de glicuronidação do (S)-(-)-carvedilol é maior do que do (R)-(+)-carvedilol (Hanioka *et al.*, 2012). Estudos em microsossomos de fígado humano mostram que ambos os enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-)-carvedilol são metabolizados a 4' e 5'-hidroxifenilcarvedilol (4OHC e 5OHC), 1, 3 e 8-hidroxicarbazolilcarvedilol (1OHC, 3OHC e 8OHC) e O-desmetilcarvedilol (DMC). As mesmas enzimas CYP estão envolvidas no metabolismo de ambos os enantiômeros, embora o enantiômero (S)-(-)-carvedilol seja metabolizado mais rapidamente que o enantiômero (R)-(+)-carvedilol (Oldham e Clarke, 1997). O CYP2D6 é a principal enzima responsável pela formação do 4OHC e 5OHC, mas o CYP2E1, CYP2C9 e CYP3A4, também apresentam pequena contribuição. A formação do 8OHC é dependente do CYP1A2 e em menor extensão do CYP3A4, enquanto a formação do DMC está claramente associada ao CYP2C9, embora existam evidências do envolvimento parcial do CYP2D6, CYP1A2 e CYP2E1 (Oldham e Clarke, 1997) (figura 9). Ressalta-se que o efeito β -bloqueador em ratos é maior para o metabólito 4OHC quando comparado ao carvedilol inalterado (Fujimaki,

Murakoshi e Hakusui, 1990). Estudos clínicos (Gehr *et al.*, 1999) mostram que os metabólitos oxidados encontrados em maiores concentrações no plasma são aqueles provenientes de enzimas CYP (4OHC, 5OHC e DMC).

Assim, o presente estudo tem o objetivo avaliar a farmacocinética dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos oxidados em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

Figura 9: Vias de metabolização oxidativa do carvedilol em microsossomos de fígado humano (Oldham e Clarke, 1997; Tenero *et al.*, 2000).

* centro quiral. DMC: desmetilcarvedilol. 4OHC e 5OHC: 4'- e 5'-

hidroxifenilcarvedilol. 1OHC, 3OHC, 8OHC: 1-, 3- e 8-hidroxicarbazolilcarvedilol.

2. Objetivos

Avaliar a influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na disposição cinética e no metabolismo dos enantiômeros do carvedilol.

3. Voluntários e protocolo clínico

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) (CEP/FCFRP nº 219) em 30 de junho de 2011 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) em 15 de julho de 2011 (apêndice I). O estudo consta de duas partes. A PARTE 1 foi conduzida em voluntários sadios e a PARTE 2 em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em uso contínuo de glibenclamida e metformina. Todos os voluntários e pacientes foram informados em detalhes sobre a proposta do estudo, a duração e os possíveis riscos envolvidos e ficaram livres para recusar a participação no estudo ou retirar seu consentimento em qualquer fase da investigação.

Os voluntários sadios e os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice I), foram submetidos a exames clínicos e testes laboratoriais para a avaliação da normalidade da função hepática (ALT, AST, gama GT, bilirrubina), função renal (uréia e creatinina, microalbuminúria) e avaliação metabólica (colesterol, triglicérides, HDL, LDL, hemoglobina glicada e glicemia de jejum) (apêndice II, tabelas I a III, página 135 a 138).

3.1 Parte 1

Na PARTE 1 do estudo foram incluídos somente os voluntários sadios fenotipados como metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (metoprolol como fármaco marcador) (Sohn *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 2000) e com *clearance* aparente do midazolam entre 10 e 40 mL/min/kg (Lamba *et al.*, 2002). Os voluntários foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP durante toda a condução do protocolo. Nas situações de intercorrências, tais como o aparecimento de efeitos colaterais, foi garantido o afastamento do voluntário do protocolo de pesquisa e o tratamento apropriado na Instituição.

Figura 10: Gráfico do tamanho da amostra em relação ao poder de teste

O cálculo do tamanho amostral da PARTE 1 do estudo foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation Version 2.1.30* (Dupont e Plummer, 1997), utilizando os parâmetros farmacocinéticos do carvedilol (AUC: 173 ± 102 ng.h/mL; (média $\pm$ DP) em voluntários sadios metabolizadores rápidos para o CYP2D6, relatados por Giessmann et al. (2004). Nossa hipótese de trabalho foi de que a interação entre carvedilol e glibenclamida + metformina iria elevar em pelo menos 50% a AUC do carvedilol. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em $p < 0,05$; poder em 80% e diferença entre as médias de AUC do carvedilol em 50%. A figura 10 mostra a variação do poder do teste de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observado, a inclusão de 13 voluntários sadios irá acarretar poder do teste acima de 80%.

Então, na PARTE 1, foram incluídos 13 voluntários sadios adultos, de ambos os sexos, com idade entre 45 e 56 anos, não obesos que foram selecionados entre os alunos e funcionários da FCFRP-USP não diretamente envolvidos com os pesquisadores associados ao projeto.

A PARTE 1 foi conduzida em duas fases cruzadas e aleatórias, ocasião 1 (somente carvedilol) e ocasião 2 (carvedilol, glibenclamida + metformina). Os 13 voluntários passaram por ambas as ocasiões e o período de *washout* entre cada fase foi de no mínimo 15 dias.

Os voluntários foram monitorados com *holter* durante todo o período da investigação em ambas as ocasiões e os valores de frequência cardíaca foram registrados durante o exercício isométrico e durante o repouso (*handgrip* Jamar®;

Simmons Preston, EUA) e utilizados como medidas de farmacodinâmica. Para isso, antes da ingestão das medicações e início das coletas de sangue, os voluntários de pesquisa foram solicitados a utilizar o *handgrip* na sua contratilidade voluntária máxima em posição supina com o braço dominante por 3 vezes intercaladas por 5 min de repouso e 30% da média da contratilidade voluntária máxima foi determinada como a carga do exercício (Kubo *et al.*, 2001).

Na ocasião 1, após o ajuste da carga do exercício isométrico com o *handgrip* e instalação do acesso venoso, os voluntários em jejum de 12 horas, receberam pela manhã, via oral, dose única de 25 mg de carvedilol racêmico (Carvedilat®, EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP) juntamente com 200 mL de água. O café da manhã foi servido 3 h após a administração do fármaco. Nos tempos zero, 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 15; 18 e 24 h após a administração do fármaco, foram realizados (1) o registro da frequência cardíaca durante o repouso, (2) durante os 2 min de exercício isométrico com o *handgrip* e (3) a colheita das amostras de sangue com seringas heparinizadas com Liquemine® 5000UI (Roche). Após centrifugação das amostras de sangue (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão), os plasmas foram separados e mantidos a -70°C. As concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol foram determinadas pelo método analítico desenvolvido e validado como descrito no capítulo 1.

Na ocasião 2, após novo ajuste da carga do exercício isométrico com o *handgrip* e instalação do acesso venoso, os voluntários sadios em estado de jejum de 12 horas, receberam pela manhã um comprimido de 5 mg de glibenclamida (Daonil®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda, Suzano, SP), um comprimido de 500 mg de metformina (Glifage®, Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ) e um comprimido de 25 mg de carvedilol racêmico com 200 mL de água. O café da manhã foi servido 3 h após a administração do fármaco. E como na ocasião 1, nos tempos zero, 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 15; 18 e 24 h após a administração do fármaco, foram realizados (1) o registro da frequência cardíaca durante o repouso, (2) durante os 2 min de exercício isométrico com o *handgrip* e (3) a colheita das amostras de sangue com seringas heparinizadas com Liquemine® 5000UI (Roche). As amostras de plasma foram obtidas e armazenadas conforme descrito na ocasião 1. As concentrações dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol nas amostras de plasmas foram determinadas pelo método analítico descrito no capítulo 1.

3.2 Parte 2

A PARTE 2 do estudo foi conduzida em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, em uso contínuo de glibenclamida (5mg 3x ao dia) e metformina (500 mg 3x ao dia), fenotipados como metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (metoprolol como marcador) (Sohn *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 2000) e com *clearance* aparente do midazolam entre 10 e 40 mL/min/kg (Lamba *et al.*, 2002). Todos os pacientes investigados foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP. Os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 apresentavam bom controle glicêmico (Sociedade Brasileira de Diabétes, 2011). A maioria (n=11) com valores de hemoglobina glicada <7% e dois menor < 7,6; sendo que todos os pacientes investigados (n=13) apresentavam glicemia plasmática de jejum $\leq$ 126 mg/dL (Apêndice, tabelas 22 e 23).

O cálculo do tamanho amostral da PARTE 2 do estudo foi obtido da mesma forma e critérios que o tamanho amostral da PARTE 1. Então, na PARTE 2 também foram investigados 13 pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com idade entre 45 e 56 anos, não obesos, não diretamente envolvidos com os pesquisadores associados ao projeto. Os voluntários portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 foram selecionados no HCFMRP-USP, Centro de Saúde Escola da FMRP-USP, Unidade Básica Distrital de Saúde da Vila Virginia, Unidade Básica Distrital de Saúde Central e Núcleo de Gestão Assistencial (NGA-59) da cidade de Ribeirão Preto, SP.

A PARTE 2 foi conduzida em uma única ocasião, ocasião 3, e assim como na PARTE 1, os pacientes foram monitorados com *holter* e os valores de frequência cardíaca foram registrados durante o exercício isométrico e durante o repouso (*handgrip* Jamar®; Simmons Preston, EUA) e utilizados como medidas de farmacodinâmica. A carga do exercício isométrico foi estabelecida como na PARTE 1. Antes da ingestão das medicações e início das coletas, os pacientes foram solicitados a utilizar o *handgrip* na sua contratilidade voluntária máxima em posição supina com o braço dominante, por 3 vezes intercaladas por 5 min de repouso, e a média da contratilidade voluntária máxima foi obtida e determinada como a carga do exercício.

Na ocasião 3, após o ajuste da carga do exercício isométrico com o *handgrip* e instalação do acesso venoso, os pacientes receberam em jejum de 12 horas, a dose matinal de 5 mg de glibenclamida e 500 mg de metformina, juntamente com um comprimido de 25 mg de carvedilol racêmico com 200 mL de água. O registro da

frequência cardíaca e a colheita das amostras de sangue foram realizados de acordo com o descrito para as ocasiões 1 e 2. Os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol em plasma foram determinados pelo método analítico descrito no capítulo 1.

4. Análise farmacocinética

No entanto durante a condução da ocasião 3 um décimo quarto indivíduo (o indivíduo 18 descrito na tabela 12 a seguir) foi identificado como metabolizador lento do CYP2D6 e embora tenha se enquadrado dentro dos demais critérios e se submetido normalmente ao protocolo de clínico, não foi incluído entre os 13 portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento na ocasião 3 durante análise farmacocinética descrita asseguir.

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol foram obtidos a partir dos dados de concentrações plasmáticas vs tempo com o *software* WinNonLin versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA), empregando o modelo 12 bicompartimental com *lag-time*. As ocasiões 1, 2 e 3 foram comparadas empregando ANOVA com Tukey HSD-*Honest Significant Differences*, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. A análise estatística foi realizada empregando o *software* R: *A language and environment for statistical computing* versão 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria, 2014).

5. Avaliação do fenótipo do CYP2D6

O metoprolol foi utilizado como fármaco marcador na avaliação do fenótipo do CYP2D6. Os voluntários sadios e pacientes receberam uma dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol (Seloken, AstraZeneca, Cotia, SP) com 200 mL de água e após 3 horas foi colhida uma única amostra de 5 mL de sangue com seringa heparinizada (Liquemine® 5000UI). Após a centrifugação das amostras de sangue (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão), as amostras de plasma foram separadas e armazenadas a -70°C até a realização das análises.

O metoprolol e o α -hidroximetoprolol em plasma foram analisados por HPLC com detecção por fluorescência de acordo com procedimento anteriormente desenvolvido e validado pelo grupo (Silva, 2008). As amostras foram preparadas como segue. Alíquotas de 1 mL de plasma foram adicionadas de 25 μ L de solução de

padrão interno (tramadol 50 µg/mL, 99,1%; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 50 µL de solução aquosa de NaOH 1 mol·L⁻¹ (J.T.Baker, pureza: 98,2%; Cidade do México), 100 mg de NaCl (Synth, pureza: 99,0%; LABSINTH, Av. Dr. Ulisses Guimarães, Diadema, SP) e 2 mL de mistura diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v, pureza 99,8%; J.T.Baker, Phillipsburg, EUA e Sigma-Aldrich, pureza 98,5%; St. Louis, MO, EUA). As amostras foram agitadas em agitador horizontal a 220 ± 10 ciclos/min durante 30 min (MA 139/CFT, Marconi, Piracicaba, SP) e após foram centrifugadas a 1800g durante 5 min (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão). Alíquotas de 1,6 mL da fase orgânica foram coletadas e evaporadas à secura em evaporador a vácuo ((Christ RVC 2-25 CD (câmera), CT 04-50 SR (condensador), bomba (vacuubrand (MZ 2C NT), Osterode am Harz, Alemanha).

Os resíduos foram retomados em 100 µL de fase móvel e 20 µL foram submetidos à análise cromatográfica. O metoprolol e seu metabólito foram separados na coluna RP Select B LiChrospher 60 (5 µm, 125 x 4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com fase móvel constituída de mistura de tampão fosfato pH 3,5 e acetonitrila na proporção de 90:10 (v/v) (Synth, pureza: 99,0%, Av. Dr. Ulisses Guimarães, Diadema, SP e J.T.Backer, pureza: 99,98%; Cidade do México) com fluxo de 1 mL/min, e foram detectados por fluorescência com comprimentos de onda de excitação e emissão de 299 nm e 298 nm. O sistema cromatográfico era composto de bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL 20ACHT, forno de coluna CTO-10ASVP, espectrofluorímetro RF-10AXL e integrador em papel Cromatopac C-R6A, todos Shimadzu (Kyoto, Japão).

Para a elaboração das curvas analíticas foram enriquecidas 6 amostras de plasma branco com 25 µL de soluções padrão em metanol resultando nas concentrações de 20, 50, 100, 250, 500, 1000 ng de metoprolol /mL de plasma e 10, 25, 50, 125, 250, 500 ng de α-hidroximetoprolol /mL de plasma (para ambos, pureza: 98% Toronto Research Chemicals (TRC), North York, Canadá).

O fenótipo do CYP2D6 foi avaliado pelo log da razão metabólica metoprolol/ α-hidroximetoprolol, sendo que valores inferiores a 1,5 designam o fenótipo metabolizador rápido do CYP2D6 (EM) e valores superiores, o fenótipo metabolizador lento (PM) (Sohn *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 2000).

$$R_m = \log_{10} \frac{\text{concentração plasmática de metoprolol}}{\text{concentração plasmática de } \alpha\text{-hidroximetoprolol}}$$

6. Avaliação do fenótipo do CYP3A4

O midazolam foi utilizado como fármaco marcador na avaliação da atividade *in vivo* do CYP3A4. Os voluntários sadios e pacientes receberam uma dose única oral de 15 mg de maleato de midazolam (Dormonid®, Roche, Rio de Janeiro, RJ) com 200 mL de água. Amostras de sangue foram colhidas nos tempos zero; 0,25; 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 horas após a administração do fármaco. As amostras de sangue foram centrifugadas (Himac CF 8DL, Hitachi, Tóquio, Japão), separados e armazenados a -70°C até a realização das análises.

A análise do midazolam em plasma humano foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometro de massas triplo quadrupolo, como descrito por Jabor e colaboradores (Jabor *et al.*, 2005) e com água purificada obtida no sistema Synergy® UV (Millipore, Molsheim, França). Alíquotas de 0,5 mL das amostras de plasma foram preparadas pelo enriquecimento com 25 µL do padrão interno clobazam 0,1 µg/mL (99,1%; Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguido por extração com 100 µL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L (J.T.Baker, pureza: 98,2%; Cidade do México) e 4mL de mistura de tolueno-álcool isoamílico (100:1 v/v, pureza: 99,9; Panreac, Barcelona e pureza: 98% Fisher Scientific, Leicestersheire, UK) sob agitação em agitador mecânico horizontal a 220 ± 10 ciclos/min por 30 min (MA 139/CFT, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após centrifugação a 2000g, por 10 min, a fase orgânica foi separadas e evaporadas até a secura.

Os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel (acetonitrila e solução de acetato de amônio 10 mmol/L (50:50 v/v)) e 40 µL foram injetados na coluna cromatografica de fase reversa Purospher RP 18-e, de 150 x 4,6 mm e partículas de 5 µm com pré-coluna de fase reversa LiChrospher 100 RP 18-e de 4 mm x 4mm e partículas de 5 µm pelo sistema cromatográfico Waters separation module e2695 dotado de bomba binaria e injetor automático.

A coluna foi mantida a 27 ± 1 °C e a separação se deu sob fase móvel composta de (1) acetonitrila (J.T.Backer, pureza: 99,98%; Cidade do México) e (2) solução de acetato de amônio 10 mmol/L (J.T.Backer, pureza: 98,9%; Cidade do México) (50:50 v/v) em fluxo de 0,7 mL/min. A detecção foi realizada no espectrômetro de massas Quatro Micro triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, UK), utilizando interface por eletronebulização no modo de ionização positivo. A temperatura de desolvatação e fonte foram ajustadas em 275 e 120 °C, a voltagem de capilar, cone, extração e RF

lens ajustada em 3 kV, 38 V, 2 V e 0,5 V, o gas de desolvatação foi nitrogênio a 450 L/h, o fluxo de gas no cone estava desligado, a energia de colisão, entrada e saída 2, 50 e 50 V. A LM resolution, HM resolution e energia iônica no primeiro quadrupolo em 10, 10, 0,5 e no terceiro quadrupolo 10,0, 10,0, e 0,1 e multiplicador em 800.

Os o midazolam e o clobazam (PI) protonados $[M+H]^+$ e seus fragmentos selecionados foram monitorados em $326 > 291$ m/z para o midazolam e $301 > 259$ m/z para o clobazam com dwell time em 0,1 s. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas no programa MassLynx, versão 4,1 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

Para a obtenção da curva analítica foram preparadas 12 soluções padrão em metanol (J.T.Backer, pureza: 99,95%; Cidade do México) que proporcionam 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100 ng/mL de midazolam em plasma após enriquecimento de 0,5 mL de plasma branco com 25 μ L das soluções padrão. As amostras para a elaboração da curva analítica foram então preparadas pelo enriquecimento de 0,5 mL de plasma branco com 25 μ L das soluções padrão e 25 μ L da solução de padrão interno (clobazam 0,1 μ g/mL), seguidas pela mesma extração descrita no preparo das amostras provenientes dos voluntários e pacientes. A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas no programa MassLynx, versão 4,1 (Waters, Milford, Massachusetts, US).

Modelos farmacocinéticos individuais do midazolam foram elaborados com o software WinNonLin versão 4,0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA) e os *clearances* aparentes obtidos permitiram verificar a atividade do CYP3A de acordo com o *clearance* aparente do midazolam da maioria dos indivíduos saudáveis que se encontra em 10 – 40 mL/min/Kg (Lamba *et al.*, 2002).

7. Avaliação do genótipo do CYP2C9

O genótipo do CYP2C9 foi realizado no laboratório de análises da unidade de pesquisa clínica e do HCFMRP-USP. O DNA foi extraído do camada leucocitária do sangue através de técnica de *salting-out* (Miller, Dykes e Polesky, 1988). O SNp rs1057910 (42614A>C) do gene do CYP2C9 relacionados a alterações da atividade do CYP2D6 foi genotipado por discriminação alélica através da reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR), utilizando ensaios tipo TaqMan[®] (Drug metabolismo genotyping assays, Applied biosystems; Foster city, CA, USA), identificados segundo o quadro asseguir.

Ensaio	SNp	Polimorfismo	Sequência
C_27104892_10	rs1057910	42614A>C	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGA TAC[C/A]TTGACCTTCTCCCCACC AGCCTGCC

No SNp: rs1799853, C=CYP2C9 *wild type*; T=CYP2C9*2 e SNp: rs1057910, A=CYP2C9 *wild type*; C=CYP2C9*3

Os ensaios TaqMan® PCR foram realizados para um volume total de reação de 10 µl em uma placa para reação contendo 96 poços com os reagentes distribuídos conforme se segue:

Reagente	Volume (µL/poço)
Master Mix (2x)	5
Taqman (20x)	0.5
DNA (30 ng/µL)	1
H ₂ O	3.5
Total:	10 µl

A amplificação do PCR foi realizada utilizando o equipamento Roche Light Cycler® 480, software versão 1.5 (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

A termociclagem consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min, 40 ciclos de amplificação a 95°C por 10 s e 60°C por 1 min e um ciclo de resfriamento a 37°C por 10 segundos. A discriminação alélica foi realizada pela medida da fluorescência fina (Endpoint genotyping analysis) dos fluoróforos VIC® e FAM® ligados no final 5' do probe Tqman® e analisadas utilizando o programa do fabricante.

8. Resultados

8.1 Avaliação do fenótipo do CYP2D6 e CYP3A4 e genótipo do CYP2C9

O fenótipo do CYP2D6 dos voluntários sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 foi avaliado empregando o metoprolol como fármaco marcador. As concentrações de metoprolol e α -hidroximetoprolol foram avaliadas em amostra de plasma obtidas 3 h após a administração de dose única de 100 mg de tartarato de metoprolol. A caracterização do fenótipo foi obtida pela razão metabólica metoprolol/ α -hidroximetoprolol conforme descrito. A tabela 9 apresenta os fenótipos do CYP2D6 dos voluntários sadios e pacientes. Apenas o indivíduo 18 apresentou fenótipo metabolizador lento para o CYP2D6 por não apresentar concentração de α -hidroximetoprolol no plasma igual ou maior que o limite inferior de quantificação do método analítico (LIQ=10 ng/mL).

A atividade *in vivo* do CYP3A4 dos voluntários sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 foi avaliada empregando o midazolam oral como fármaco marcador. Os valores de *clearance* aparente estão apresentados como dados individuais na tabela 9. Todos os voluntários e pacientes incluídos na pesquisa apresentaram *clearance* aparente do midazolam dentro do intervalo proposto por Lamba et al. (2002) na investigação de voluntários sadios (10 – 40 mL/min/Kg ou 0,6 L/h/Kg – 2,4 L/h/Kg).

O genótipo do CYP2C9, identificado através de PCR conforme descrito no item 7, está descrito na tabela 9 para todos os sujeitos da pesquisa. Não foram identificados os alelos CYP2C9*3 que é relacionados com acentuada redução na atividade do CYP2C9 (Kirchheiner et al., 2003).

Tabela 9: Dados individuais dos voluntários sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina incluídos no estudo (n=27)

ID	Estado de Saúde	Idade (Anos)	Gênero	IMC (Kg/m ²)	Peso (Kg)	Log (Rm)	Fenótipo CYP2D6	CL/F midazolam L/h/Kg	CYP2C9*3
1	Sadio	53	Masculino	25,1	69,17	0,452903	EM	0,645	AA
2	Sadio	48	Masculino	24,8	81,25	0,137349	EM	0,891	AC
3	Sadio	49	Feminino	26,1	66,82	-0,45559	EM	1,297	AA
4	Sadio	55	Feminino	20,8	52,58	1,121429	EM	1,606	AA
5	Sadio	53	Masculino	27,2	73,16	0,21487	EM	0,844	AC
6	Sadio	45	Masculino	26,4	84,59	-0,07709	EM	0,702	AA
7	Sadio	56	Feminino	25,7	66,62	-0,18785	EM	0,655	AA
8	Sadio	56	Masculino	24,5	62,72	0,291814	EM	1,456	AA
9	Sadio	54	Masculino	25,4	72,54	0,088123	EM	1,001	AC
10	Sadio	52	Masculino	26,5	70,5	0,52178	EM	1,147	AA
11	Sadio	52	Masculino	25,7	69,97	0,257223	EM	0,813	AA
12	Sadio	46	Masculino	21,5	62,14	0,14897	EM	1,563	AA
13	Sadio	51	Masculino	24,9	67,81	0,668472	EM	0,626	AA
14	Diabético	53	Masculino	27,57	74,43	0,72584	EM	0,630	AA
15	Diabético	48	Feminino	27,36	76,07	-0,20805	EM	0,671	AC
16	Diabético	46	Masculino	26,53	70,49	0,762166	EM	1,572	AA
17	Diabético	55	Masculino	27,68	75,36	-0,12458	EM	1,281	AA
18	Diabético	53	Feminino	26,25	61,45	--	PM	1,122	AA
19	Diabético	46	Masculino	29,24	74,85	0,238526	EM	1,045	AA
20	Diabético	57	Masculino	26,35	76,15	0,098124	EM	0,647	AA
21	Diabético	48	Masculino	24,8	63,49	0,389051	EM	1,303	AA
22	Diabético	55	Masculino	25,44	65,94	0,764686	EM	1,488	AA
23	Diabético	47	Feminino	26,59	60,24	0,869593	EM	0,604	AA
24	Diabético	50	Feminino	25,20	64,51	0,257223	EM	1,185	AA
25	Diabético	52	Masculino	27,11	84,9	0,323045	EM	0,682	AA
26	Diabético	45	Masculino	23,2	75,17	0,45871	EM	0,959	AA
27	Diabético	43	Feminino	22,8	72,1	0,2785	EM	0,874	AA

RM=razão metabólica metoprolol/ α -hidroximetoprolol. RM do sujeito 18 não foi calculada porque a concentração de α -hidroximetoprolol < LIQ. Indivíduos: Voluntários sadios e pacientes incluídos. EM: metabolizadores rápido para o CYP2D6. PM: metabolizadores lento para o CYP2D6. CYP2C9*3 = CC; AA e AC = CYP2C9 *wild type* (não CYP2C9*3)

8.2 Análise farmacocinética dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol, e O-desmetilcarvedilol.

Todos os voluntários sadios (n=13) e pacientes (n=13) incluídos no presente estudo não apresentaram reações adversas clinicamente significativas durante o período do estudo. Apenas o indivíduo 11 (voluntário sadio) recebeu soro glicosado durante o período de jejum. Todos os voluntários e pacientes apresentaram funções hepática e renal dentro dos limites da normalidade demonstrada por exames bioquímicos realizados antes e durante a condução do protocolo clínico (apêndice II, tabelas I a III).

A disposição cinética dos enantiômeros do carvedilol e dos metabólitos formados pelo CYP2D6 (hidroxifenilcarvedilol) e CYP2C9 (O-desmetilcarvedilol) foram avaliadas em voluntários sadios não comedicionados (ocasião 1) e comedicionados com dose única oral de glibenclamida e metformina (ocasião 2) e em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina (ocasião 3). Todos os voluntários e pacientes receberam dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico, sendo analisadas as concentrações plasmáticas (0-24 h) dos enantiômeros do carvedilol e dos metabólitos. Os parâmetros farmacocinéticos obtidos em cada ocasião estão apresentados nas tabelas 10 a 17 como média geométrica e intervalos de confiança (IC 95%) (parâmetros individuais apresentados no apêndice II, tabelas IV a IX). As figuras 11 e 12 apresentam a média e intervalos de confiança 95% das concentrações plasmáticas vs tempo para os voluntários sadios e pacientes diabéticos. As figuras 13 e 14 mostram os valores de AUC dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos, evidenciando as diferenças entre as ocasiões 1, 2 e 3 e entre os enantiômeros (R)-(+) e (S)-(-) do carvedilol e seus metabólitos.

Figura 11: Curvas concentração plasmática vs tempo para os enantiômeros do carvedilol, hidroxicarvedilol e O-desmetilcarvedilol.

Os dados estão apresentados como médias e intervalos de confiança 95% para todos os voluntários e pacientes investigados (n=39).

Figura 12: Curvas concentração plasmática vs tempo para os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol para os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (n=13) e voluntários sadios não comeditados (n=13). Os dados estão apresentados como médias e intervalos de confiança 95%.

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-carvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação de glibenclamida e metformina e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

Parâmetros (unidade)	Média geométrica (IC95%)			Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)			
AUC_{0-∞} (ng.h/mL)	35,00 (24,61 – 52,63)	34,07 (29,20 – 41,41)	39,49 (19,74 – 88,19)	Controle / Interação	1,03 (0,86 - 1,25)	0,61
				Controle / Diabetes	1,13 (0,91 - 1,51)	0,38
				Interação / Diabetes	1,16 (0,77 - 1,90)	0,26
				Controle / Interação	1,03 (0,86 - 1,25)	1,00
CL/F (L/h)	357,25 (303,20 – 461,16)	366,91 (305,51 – 457,62)	316,5221 (211,06 - 601,79)	Controle / Diabetes	1,13 (0,91 - 1,51)	0,80
				Interação / Diabetes	1,16 (0,77 – 1,90)	0,80
				Controle / Interação	1,76 (0,40 – 4,53)	0,12
				Controle / Diabetes	1,06 (-0,72 – 5,18)	0,30
V2/F (L)	757,66 (578,85 - 1604,17)	1332,43 (1003,43 - 1973,58)	713,1295 (525,67 - 2956,50)	Interação / Diabetes	1,87 (-9,83 – 8,36)	0,68
				Controle / Interação	1,26 (1,04- 1,57)	0,54
				Controle / Diabetes	1,45 (1,24 – 1,78)	0,43
				Interação / Diabetes	1,83 (1,57 – 2,24)	0,21
T1/2 (h)	5,28 (4,23 - 7,18)	5,73 (3,13 - 10,99)	5,90 (4,28 - 9,15)	Controle / Interação	1,09 (0,83 - 1,45)	0,46
				Controle / Diabetes	1,12 (1,00 – 1,27)	0,44
				Interação / Diabetes	1,03 (0,87 - 1,24)	0,87
				Controle / Interação	1,00 (0,93 - 1,08)	0,84
Tmax (h)	0,70 (0,57 - 0,95)	0,70 (0,58 - 0,89)	0,79 (0,62 - 1,16)	Controle / Diabetes	1,12 (1,03 1,23)	0,41
				Interação / Diabetes	1,12 (1,00 - 1,30)	0,31
				Controle / Interação	1,23 (0,91 – 1,77)	0,24
				Controle / Diabetes	1,21 (0,86 – 1,97)	0,46
Cmax (ng/mL)	13,04 (5,10 - 33,56)	10,58 (7,70 - 16,67)	15,77 (11,36 - 41,49)	Interação / Diabetes	1,49 (1,14 – 2,43)	0,07

p>0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). Cmax: concentração plasmática máxima; Tmax: tempo para alcançar Cmax; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T1/2: meia-vida de eliminação; V1/F: volume de distribuição central aparente; V2/F: volume de distribuição periférico aparente. CL/F: *clearance* aparente. Valor p: valor p ajustado do teste de Tukey HSD

Tabela 11: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-carvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação de glibenclamida e metformina e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

	Média geométrica (IC95%)					
Parâmetros (unidade)	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)	Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
AUC0-∞ (ng.h/mL)	73,06 (56,03 – 103,97)	76,43 (62,11 – 100,29)	87,29 (65,65 – 143,68)	Controle / Interação	1,05 (0,98 – 1,12)	0,89
				Controle / Diabetes	1,19 (1,04 – 1,42)	0,25
				Interação / Diabetes	1,14 (0,98 – 1,41)	0,25
CI/F (L/h)	171,01 (139,01 – 231,50)	163,55 (133,62 – 213,58)	143,19 (95,36 – 257,50)	Controle / Interação	1,05 (0,98 – 1,12))	0,41
				Controle / Diabetes	1,19 (1,04 – 1,42)	0,84
				Interação / Diabetes	1,14 (0,98 – 1,41)	0,95
V2/F (L)	350,08 (225,97 – 727,72)	359,45 (284,78 – 497,24)	405,17 (133,51 – 1116,47)	Controle / Interação	1,03 (0,84 – 1,36)	0,50
				Controle / Diabetes	1,16 (0,96 – 1,45)	0,56
				Interação / Diabetes	1,13 (0,71 – 1,90)	0,33
V1/F (L)	277,57 (222,00 – 469,60)	323,05 (241,31 – 541,20)	230,93 (160,55 – 457,78)	Controle / Interação	1,16 (0,99 – 1,42)	0,59
				Controle / Diabetes	1,20 (0,98 – 1,55)	0,68
				Interação / Diabetes	1,40 (1,15 – 1,78)	0,40
T1/2 (h)	4,52 (2,13 – 10,40)	4,41 (3,44 – 6,18)	4,84 (3,64 – 7,15)	Controle / Interação	1,02 (0,76 – 1,47)	0,49
				Controle / Diabetes	1,07 (0,91 – 1,35)	0,67
				Interação / Diabetes	1,10 (1,00 – 1,21)	0,57
Tmax (h)	0,79 (0,66 – 1,07)	0,74 (0,61 – 0,95)	0,91 (0,66 – 1,45)	Controle / Interação	1,07 (0,96 – 1,22)	0,35
				Controle / Diabetes	1,15 (0,98 – 1,37)	0,36
				Interação / Diabetes	1,15 (0,98 – 1,37)	0,19
Cmax (ng/mL)	23,54 (8,47 – 55,75)	23,21 (16,09 – 38,20)	31,58 (20,92 – 72,12)	Controle / Interação	1,01 (0,79 – 1,34)	0,60
				Controle / Diabetes	1,34 (1,03 – 1,98)	0,37
				Interação / Diabetes	1,36 (1,11 – 1,87)	0,15

p>0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação; V₁/F: volume de distribuição central aparente; V₂/F: volume de distribuição periférico aparente. CL/F: *clearance* aparente. Valor p: valor p ajustado do teste de Tukey HSD

Tabela 12: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

	Média geométrica (IC95%)					
Parâmetros (unidade)	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)	Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
AUC0-∞ (ng·h/mL)	1,45 (1,14 - 1,95)	1,50 (1,20 - 2,10)	7,21 (5,50 - 10,20)	Controle / Interação	1,03 (0,89 - 1,24)	0,57
				Controle / Diabetes	4,97 (4,77 – 5,20)	9,21e-5**
				Interação / Diabetes	4,81 (4,18 – 5,71)	1,05e-4**
T1/2 (h)	6,93 (4,18 - 13,02)	6,43 (4,59 - 10,87)	5,34 (4,16 - 7,90)	Controle / Interação	1,06 (0,94 – 1,26)	0,73
				Controle / Diabetes	1,30 (1,10 – 1,57)	0,25
				Interação / Diabetes	1,20 (1,06 – 1,41)	0,31
Tmax (h)	0,66 (0,51 – 1,00)	0,80 (0,65 - 1,04)	0,86 (0,68 - 1,21)	Controle / Interação	1,21 (1,04 – 1,46)	0,45
				Controle / Diabetes	1,31 (1,16 – 1,52)	0,24
				Interação / Diabetes	1,08 (0,99 – 1,19)	0,51
Cmax (ng/mL)	0,50 (0,33 – 0,88)	0,46 (0,37 – 0,62)	2,07 (1,31 – 4,50)	Controle / Interação	1,08 (0,90 – 1,34)	0,44
				Controle / Diabetes	4,13 (3,50 – 5,12)	9,1e-3**
				Interação / Diabetes	4,46 (3,41 – 6,53)	6,8e-3**

**p<0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação. Valor p: valor p ajustado do teste de de Tukey HSD.

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina

Parâmetros (unidade)	Média geométrica (IC95%)			Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)			
AUC_{0-∞} (ng.h/mL)	4,88 (4,05 – 6,23)	6,60 (5,49 – 8,39)	13,89 (11,21 – 18,43)	Controle / Interação	1,35 (1,27 – 1,45)	0,23
				Controle / Diabetes	2,85 (2,64 – 3,10)	7,9e-5**
				Interação / Diabetes	2,85 (2,64 – 3,10)	4,9e-4**
T_{1/2} (h)	7,54 (5,63 – 11,64)	5,03 (3,73 – 6,33)	5,84 (1,51 – 14,64)	Controle / Interação	1,61 (1,44 – 1,86)	0,06
				Controle / Diabetes	1,29 (1,11 – 1,61)	0,87
				Interação / Diabetes	1,29 (1,11 – 1,61)	0,34
T_{max} (h)	0,96 (0,79 – 1,26)	0,82 (0,67 – 1,06)	1,00 (0,73 – 1,53)	Controle / Interação	1,18 (1,10 – 1,27)	0,21
				Controle / Diabetes	1,04 (0,91 – 1,22)	0,61
				Interação / Diabetes	1,23 (1,08 – 1,44)	0,20
C_{max} (ng/mL)	1,44 (1,20 – 1,87)	2,05 (1,43 – 3,43)	4,64 (3,83 – 7,56)	Controle / Interação	1,01 (0,79 – 1,34)	0,10
				Controle / Diabetes	1,34 (1,03 – 1,98)	1,5e-3**
				Interação / Diabetes	1,36 (1,11 – 1,87)	9,9e-3**

**p<0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação. Valor p: valor p ajustado do teste de Tukey HSD.

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina

Parâmetros (unidade)	Média geométrica (IC95%)			Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)			
AUC_{0-∞} (ng.h/mL)	3,98 (2,80 – 6,80)	4,26 (3,30 – 6,39)	2,36 (1,95 – 3,08)	Controle /	1,07	0,92
				Interação	(0,97 – 1,20)	
				Controle /	1,68	0,03**
				Diabetes	(1,40 – 2,11)	
T_{1/2} (h)	7,65 (2,62 – 20,12)	5,28 (3,62 – 9,56)	6,33 (4,89 – 9,96)	Interação /	1,80	7,6e-3**
				Diabetes	(1,61 – 2,06)	
				Controle /	1,45	0,18
				Interação	(1,11 – 1,96)	
T_{max} (h)	0,70 (0,56 – 1,01)	0,82 (0,67 – 1,05)	0,99 (0,73 – 1,49)	Controle /	1,21	0,36
				Diabetes	(0,87 – 1,77)	
				Interação /	1,20	0,64
				Diabetes	(1,03 – 1,46)	
C_{max} (ng/mL)	1,20 (0,91 – 2,01)	1,28 (1,00 – 2,04)	0,49 (0,35 – 0,91)	Controle /	1,16	0,43
				Interação	(1,04 – 1,32)	
				Controle /	1,41	0,11
				Diabetes	(1,26 – 1,60)	
				Interação /	1,22	0,21
				Diabetes	(1,08 – 1,38)	
				Controle /	1,06	0,82
				Interação	(0,92 – 1,26)	
				Controle /	2,43	8,9e-3**
				Diabetes	(2,06 – 2,96)	
				Interação /	2,59	4,1e-3**
				Diabetes	(2,30 – 2,97)	

**p<0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação. Valor p: valor p ajustado do teste de de Tukey HSD.

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol em voluntários sadios sem e com comedicação (glibenclamida e metformina) e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

Parâmetros (unidade)	Média geométrica (IC95%)			Razão entre ocasiões Média (IC50%)		Valor P
	Sadio sem comedicação (controle) (n=13)	Sadio com comedicação (interação) (n=13)	Diabetes com comedicação (n=13)			
AUC_{0-∞} (ng.h/mL)	11,91 (10,09 – 14,69)	10,40 (8,59 – 13,22)	6,92 (5,54 – 9,56)	Controle / Interação	1,14 (1,09 – 1,21)	0,39
				Controle / Diabetes	1,72 (1,53 – 1,97)	2,1e-3**
				Interação / Diabetes	1,50 (1,34 – 1,71)	0,025**
T_{1/2} (h)	5,26 (4,02 – 8,06)	4,77 (3,54 – 6,83)	4,91 (4,28 – 5,79)	Controle / Interação	1,10 (0,93 – 1,36)	0,35
				Controle / Diabetes	1,07 (0,89 – 1,37)	0,32
				Interação / Diabetes	1,03 (0,93 – 1,16)	0,86
T_{max} (h)	0,76 (0,61 – 1,05)	0,84 (0,66 – 1,18)	1,63 (0,37 – 2,90)	Controle / Interação	1,11 (1,05 – 1,17)	0,59
				Controle / Diabetes	1,58 (1,04 – 2,46)	0,19
				Interação / Diabetes	1,11 (1,05 – 1,17)	0,25
C_{max} (ng/mL)	4,18 (3,16 – 6,12)	3,14 (2,49 – 4,71)	1,76 (1,37 – 2,91)	Controle / Interação	1,33 (1,18 – 1,53)	0,12
				Controle / Diabetes	2,38 (1,84 – 3,22)	4,4e-3**
				Interação / Diabetes	2,38 (1,84 – 3,22)	0,028**

**p<0,05 entre as ocasiões (ANOVA, Tukey HSD - *Honest Significant Differences*). C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação. Valor p: valor p ajustado do teste de de Tukey HSD.

Tabela 16: Valores de $AUC^{0-\infty}$ para os enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol. Os dados estão apresentados como média geométrica (IC95%).

		carvedilol	hidroxifenilcarvedilol	O-desmetilcarvedilol
(R)-(+)	Voluntário sadio Controle (n=13)	73,06* (56,03 – 103,97)	4,88* (4,05 – 6,23)	11,91* (10,09 – 14,69)
	Voluntário sadio Interação (n=13)	76,43* (62,11 – 100,29)	6,60* (5,49 – 8,39)	10,40* (8,59 – 13,22)
	Paciente diabético (n=13)	87,29* (65,65 – 143,68)	13,89* (11,21 – 18,43)	6,92* (5,54 – 9,56)
(S)-(-)	Voluntário sadio Controle (n=13)	35,00 (24,61 – 52,63)	1,45 (1,14 – 1,95)	3,98 (2,80 – 6,80)
	Voluntário sadio Interação (n=13)	34,07 (29,20 – 41,41)	1,50 (1,20 – 2,10)	4,26 (3,30 – 6,39)
	Paciente diabético (n=13)	39,49 (19,74 – 88,19)	7,21 (5,50 – 10,20)	2,36 (1,95 – 3,08)

* $p < 0,05$ test t de Student ((R)-(+)) vs (S)-(-)

Controle: sem a comedicação de glibenclamida e metformina. Interação: com a comedicação de glibenclamida e metformina.

Figura 13: Área sob a curva da concentração plasmática vs tempo ($AUC^{0-\infty}$) dos enantiômeros do carvedilol (A) e seus metabólitos (B).

Ocasão 1: voluntários saudáveis sem medicação (n=13), ocasião 2: voluntários saudáveis com medicação (n=13), ocasião 3: portadores de diabetes em tratamento (n=13)

Tabela 17: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos em um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 fenotipado como PM para o CYP2D6

Enantiômero	AUC _{0-∞} (ng.h/mL)	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)
(R)-(+)-carvedilol	107,17	4,01	4,15	22,21
(S)-(-)-carvedilol	25,091	4,28	3,31	20,73
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol	2,46	0,34	2,97	0,31
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol	1,88	3,13	3,24	0,22
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol	48,92	3,52	3,49	4,50
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol	21,05	6,63	3,83	2,16

C_{max}: concentração plasmática máxima; T_{max}: tempo para alcançar C_{max}; AUC_{0-∞}: área sob a curva de 0 a infinito; T_{1/2}: meia-vida de eliminação.

Figura 14: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo (AUC_{0-∞}) dos enantiômeros do carvedilol (A) e seus metabólitos (B).

Ocasião 3: Diabéticos tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina fenotipados como EM para o CYP2D6 (n=13), ocasião 4: Paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina fenotipado como PM para o CYP2D6 (n=1).

8.3 Análise farmacocinética-farmacodinâmica

Os dados de frequência cardíaca durante o repouso e durante os 2 min de exercício isométrico com o *handgrip*, referentes aos grupos voluntários sadios sem medicação (n=13), voluntários sadios comedicação (n=13) e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (n=13) serão apresentados e discutidos no Capítulo 3.

9. Discussão

O presente estudo investiga a influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na disposição cinética e no metabolismo oxidativo dos enantiômeros do carvedilol em pacientes com bom controle glicêmico, fenotipados como metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (EM) e em tratamento com glibenclamida e metformina. No presente estudo, os enantiômeros do metabólito hidroxicarvedilol foram avaliados como a soma dos metabólitos 4'-hidroxifenilcarvedilol e 5'-hidroxifenilcarvedilol, de acordo com a descrição no capítulo 1.

Os metabólitos oxidados do carvedilol presentes em maiores concentrações no plasma humano são o 4'-hidroxifenilcarvedilol e o 5'-hidroxifenilcarvedilol dependentes da atividade do CYP2D6 e em menor extensão do CYP2E1, CYP2C9 e CYP3A4 e o O-desmetilcarvedilol dependente da atividade do CYP2C9 com alguma contribuição do CYP2D6, CYP1A2 e CYP2E1 (Oldham e Clarke, 1997; Gehr *et al.*, 1999; Tenero *et al.*, 2000). Ressalta-se que o estudo *in vitro* com microsomas de fígado humano para a identificação das isoformas CYP envolvidas no metabolismo do carvedilol foi conduzido com os enantiômeros individuais do carvedilol com relatos de metabolismo mais rápido para o enantiômero (S)-(-)-carvedilol e envolvimento das mesmas isoformas CYP no metabolismo de ambos os enantiômeros (Oldham e Clarke, 1997).

Assim como para o paciente investigado no capítulo anterior e conforme informação já bem estabelecida na literatura (Neugebauer *et al.*, 1990; Gehr *et al.*, 1999; Tenero *et al.*, 2000; Tenero *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2010; Furlong *et al.*, 2012), observa-se acúmulo plasmático do enantiômero (R)-(+)-carvedilol nos voluntários sadios investigados sem e com comedicação (ocasião 1 e ocasião 2) e nos pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (ocasião 3) (figuras 11 e 12, tabelas 10 e 11). Os valores de área sob a curva de concentração plasmática vs tempo (AUC) do enantiômero (R)-(+)-carvedilol são aproximadamente o dobro daqueles observados para o antípoda (S)-(-)-carvedilol em todos os grupos investigados (tabela 16). Em relação aos metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol (tabela 16), as razões enantioméricas (R)-(+)/(S)-(-) de AUC são próximas a 3 para os voluntários sadios e para os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2. As maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol foram anteriormente reportadas por Furlong *et al.* (2012) na investigação de voluntários

sadios, enquanto maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol foram reportadas por Eisenberg et al. (1989).

O acúmulo plasmático do enantiômero (R)-(+)-carvedilol não pode ser explicado em função do metabolismo oxidativo preferencial do enantiômero (S)-(-)-carvedilol, pois observa-se também acúmulo plasmático dos enantiômeros (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. Portanto, a menor exposição ao enantiômero (S)-(-)-carvedilol está relacionada a outros mecanismos de eliminação não dependentes de isoformas CYP, tais como a glicuronidação ou o envolvimento de transportadores como, por exemplo, a P-gp intestinal no processo de absorção dos enantiômeros do carvedilol (Neugebauer e Neubert, 1991; Tenero *et al.*, 2000; Giessmann *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2004; Takara, Sakaeda e Okumura, 2004; Albers *et al.*, 2008; Hanioka *et al.*, 2012). Ressalta-se que um estudo de biodisponibilidade oral dos enantiômeros do carvedilol conduzido em voluntários sadios mostra valores de 31,1% (20,2-36,5%) para o enantiômero (R)-(+) em comparação com 15,1% (10,4-24,4%) para o enantiômero (S)-(-)-carvedilol (Neugebauer *et al.*, 1990). Considerando que o presente estudo envolveu somente a administração do carvedilol por via oral, os parâmetros dependentes da biodisponibilidade, tais como o *clearance* e o volume de distribuição, foram calculados como valores aparentes, impossibilitando determinar qual o parâmetro farmacocinético responsável pela observação da enantiosseletividade.

Os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol obtidos para o grupo de voluntários sadios não comedificados (tabelas 10 e 11) estão de acordo com estudos anteriores da literatura (Neugebauer *et al.*, 1990; Zhou e Wood, 1995; Phuong *et al.*, 2004).

A proposta inicial do estudo estava centrada na influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do carvedilol, sendo investigado apenas um grupo de voluntários sadios como controle. No entanto, todos os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 faziam uso de glibenclamida (5 mg/8h) e metformina (500 mg/8h) para o controle dos níveis glicêmicos. Considerando o carvedilol um substrato das proteínas transportadoras P-gp e MRP2 presentes na mucosa intestinal, canalículos hepáticos e células do túbulo proximal dos rins (Giessmann *et al.*, 2004) e considerando a glibenclamida um substrato e potente inibidor competitivo do CYP2C9 (Kim e Park, 2003), assim como um inibidor da P-gp

(Golstein *et al.*, 1999; Bessadok *et al.*, 2011), foi investigado um grupo de voluntários sadios tratados com dose única oral de glibenclamida (5 mg) e metformina (500 mg) com o propósito de diferenciar um possível efeito da comedicação do efeito do diabetes.

Quando o grupo de voluntários sadios sem comedicação (controle, ocasião 1) foi comparado com o grupo de voluntários sadios com comedicação (interação, ocasião 2), não foram observadas diferenças com significância estatística entre os grupos para ambos os enantiômeros do carvedilol (tabelas 10 e 11) ou seus metabólitos hidroxifenilcarvedilol (tabelas 12 e 13) e O-desmetilcarvedilol (tabelas 14 e 15), inferindo que a administração de dose única terapêutica de glibenclamida e metformina não altera a disposição cinética e o metabolismo enantiosseletivos do carvedilol (figura 13).

A comparação do grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 com o grupo de voluntários sadios não medicados (controle) ou com o grupo de voluntários sadios com comedicação (interação) não mostra diferenças com significância estatística para os parâmetros farmacocinéticos de ambos os enantiômeros do carvedilol (tabelas 10 e 11), inferindo que o diabetes com bom controle glicêmico em tratamento ao uso contínuo de glibenclamida e metformina não altera a disposição de ambos os enantiômeros do carvedilol. No entanto, a investigação do metabolismo oxidativo do carvedilol foi alterada nos pacientes diabéticos em tratamento com glibenclamida e metformina com observação de menor formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol [AUC: 2,36 vs 3,98 ng.h/mL para o enantiômero (S)-(-) e 6,92 vs 11,91 ng.h/mL para o enantiômero (R)-(+)] compensada pela maior formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol [AUC: 7,21 vs 1,45 ng.h/mL para o enantiômero (S)-(-) e 13,89 vs 4,88 ng.h/mL para o enantiômero (R)-(+)]; tabelas 12-15. Os dados observados no grupo de pacientes diabéticos medicados com glibenclamida e metformina sugerem que as alterações na atividade do CYP2D6 e CYP2C9 alteram a formação de ambos os enantiômeros de cada metabólito na mesma extensão, corroborando com os dados de envolvimento das mesmas isoformas CYP no metabolismo de ambos os enantiômeros do carvedilol (Oldham e Clarke, 1997).

A menor capacidade de formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol nos pacientes diabéticos em tratamento com glibenclamida e

metformina, infere inibição da atividade do CYP2C9 provavelmente causada pelo uso contínuo de glibenclamida, um inibidor competitivo do CYP2C9 (Kim e Park, 2003). A influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na inibição da atividade do CYP2C9 é menos provável considerando que os pacientes investigados apresentavam bom controle dos níveis glicêmicos e ausência de comorbidades. Estudos anteriores (Ueda *et al.*, 1963; Dostalek, Akhlaghi e Puzanovova, 2012) relatam que o metabolismo da tolbutamida dependente da atividade do CYP2C9 não é modificado em pacientes diabéticos e Dostalek *et al.* (2012) relatam aumento da atividade de enzimas CYP e redução na capacidade do metabolismo de fase II mas em diabéticos que não apresentam bom controle dos níveis glicêmicos, portanto em situação de hiperglicemia.

Ressalta-se ainda que no presente estudo a administração de dose única de glibenclamida e metformina não alterou a disposição cinética e o metabolismo de ambos os enantiômeros do carvedilol nos voluntários sadios investigados, pois a administração de dose única de glibenclamida provavelmente não resulta em concentrações compatíveis com a inibição competitiva do CYP2C9.

A maior capacidade de formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol nos pacientes investigados portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina, aparentemente não decorre de indução do CYP2D6, uma enzima com relatos de indução apenas durante a gestação (Tracy *et al.*, 2005), mas sim por maior disponibilidade de ambos os enantiômeros do carvedilol em função da redução da atividade do CYP2C9. Em resumo, a maior capacidade de formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol compensa a menor capacidade de formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol, de forma a não alterar a disposição cinética de ambos os enantiômeros do carvedilol.

Uma observação semelhante foi descrita por Giessmann *et al.* (2004) na investigação de voluntários sadios metabolizadores lentos e metabolizadores rápidos para o CYP2D6 tratados com dose única intravenosa de carvedilol racêmico. Os autores não observaram alterações na disposição de ambos os enantiômeros do carvedilol quando os metabolizadores lentos foram comparados com os metabolizadores rápidos do CYP2D6. Embora os autores não tenham proposto um possível mecanismo, a menor capacidade de metabolização pelo CYP2D6 nos

metabolizadores lentos foi compensada pela maior capacidade de metabolização pelo CYP2C9.

Dentre os 27 pacientes investigados, somente um paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 foi fenotipado como metabolizador lento para o CYP2D6 e avaliado fora do grupo constituído por 13 pacientes diabéticos metabolizadores rápidos para o CYP2D6 (ocasião 3). Os parâmetros farmacocinéticos apresentados na tabela 17 e figura 14 para o paciente diabético metabolizador lento permitem inferir que o fenótipo metabolizador lento não altera a disposição cinética de ambos os enantiômeros do carvedilol, de acordo com os dados previamente reportados por Giessmann et al. (2004). No entanto, é possível observar redução na formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol dependente da atividade do CYP2D6, compensada pelo aumento na formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol dependente da atividade do CYP2C9.

10. Conclusão

1-A disposição cinética e o metabolismo do carvedilol são enantiosseletivos em voluntários sadios com maiores valores de AUC para os enantiômeros (R)-(+) (carvedilol: 73,06 vs 35,00 ng.h/mL; hidroxicarvedilol: 4,88 vs 1,45 ng.h/mL; O-desmetilcarvedilol: 11,91 vs 3,98 ng.h/mL).

2-A disposição cinética e o metabolismo dos enantiômeros do carvedilol não diferem entre os grupos de voluntários não comedicionados e comedicionados com dose única oral de glibenclamida (5 mg) e metformina (500 mg).

3-O metabolismo dos enantiômeros do carvedilol a O-desmetilcarvedilol, dependente do CYP2C9, difere entre o grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (pacientes metabolizadores rápidos com bom controle glicêmico e em tratamento com glibenclamida 5 mg/8h e metformina 500 mg/8h) e o grupo de voluntários sadios com comedicação (interação) ou o grupo de voluntários sadios não comedicionados (controle). Os valores de AUC de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol [(R)-(+): 6,92 vs 10,40 vs 11,91 ng.h/mL e (S)-(-): 2,36 vs 4,26 vs 3,98 ng/h/mL] são menores no grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

4- O metabolismo dos enantiômeros do carvedilol a hidroxifenilcarvedilol, dependente do CYP2D6, difere entre o grupo de pacientes portadores de diabetes

mellitus tipo 2 (pacientes com bom controle glicêmico e em tratamento com glibenclamida 5 mg/8h e metformina 500 mg/8h) e o grupo de voluntários sadios com comedicação (interação) ou o grupo de voluntários sadios não comedificados (controle). Os valores de AUC de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol [(R)-(+): 13,89 vs 6,60 vs 4,88 ng.h/mL e (S)-(-): 7,21 vs 1,50 vs 1,45 ng/h/mL] são maiores no grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

5- A disposição cinética dos enantiômeros do carvedilol não difere entre o grupo de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (pacientes com bom controle glicêmico e em tratamento com glibenclamida 5 mg/8h e metformina 500 mg/8h) e o grupo de voluntários sadios não comedificados (controle) ou o grupo de voluntários sadios com comedicação (interação).

6- Os parâmetros farmacocinéticos de um paciente metabolizador lento do CYP2D6, portador de diabetes *mellitus* tipo 2 e em tratamento com glibenclamida 5 mg/8h e metformina 500 mg/8h, permite inferir redução na formação de ambos os enantiômeros do metabólito hidroxifenilcarvedilol compensada pelo aumento na formação de ambos os enantiômeros do metabólito O-desmetilcarvedilol. Logo, a disposição cinética de ambos os enantiômeros do carvedilol sob a forma inalterada não difere entre metabolizadores rápidos e lentos do CYP2D6.

Capítulo 3

Farmacocinética populacional dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos em voluntários saudáveis e pacientes portadores de diabetes *melitus* tipo 2

1. Introdução

O carvedilol é um antagonista competitivo de receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e α_1 (Kubo *et al.*, 2001; Stoschitzky *et al.*, 2001). Stoschitzky *et al.* (2001) reportam que o carvedilol racêmico administrado em dose única reduz a frequência cardíaca em voluntários sadios somente durante o exercício. É provável que o aumento do tônus simpático, causado pela vasodilatação resultante do α -bloqueio, seja alto o suficiente para anular o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos em voluntários sadios em repouso. Baseado neste conceito o exercício com o *handgrip* (exercício isométrico) pode induzir aumento da pressão arterial acompanhado por aumento da frequência cardíaca e da resistência vascular periférica na musculatura esquelética em repouso (Kamiya *et al.*, 2001).

A relação entre a concentração plasmática do enantiômero (S)-(-)-carvedilol (enantiômero responsável pela atividade β -bloqueadora) e a redução da frequência cardíaca no exercício isométrico com o *handgrip* pode ser analisada simultaneamente utilizando modelos matemáticos. O modelo farmacocinético-farmacodinâmico (PK-PD) é, portanto, a descrição matemática das relações existentes entre a farmacocinética e a farmacodinâmica do medicamento. O conhecimento do modelo PK-PD e dos parâmetros estimados a partir dele permitem a previsão racional do perfil concentração plasmática vs efeito e do estabelecimento de regimes de dosagem para populações específicas (Stoschitzky *et al.*, 2001).

A análise farmacocinética e farmacodinâmica populacional empregando modelos hierárquicos não lineares de efeitos mistos foi originalmente proposta para ser utilizada em dados oriundos de amostras clínicas rotineiramente coletadas, de forma escassa, dispersa e em população heterogênea (Sheiner, Rosenberg e Marathe, 1977; Sheiner e Beal, 1980; 1983). No entanto, estes modelos atualmente estão sendo aplicados em estudos clínicos controlados para gerar informações farmacocinéticas e farmacodinâmicas a partir de amostragens esparsas ou frequentes, em grandes ou pequenas populações e em todas as fases do desenvolvimento de fármacos (Aarons, 1993; Schoemaker e Cohen, 1996), sendo uma ferramenta de análise cada vez mais encorajada pelo FDA (Food and drug administration, 1999), mas muito pouco utilizada no Brasil.

Os modelos hierárquicos não lineares de efeitos mistos permitem estimar o valor de cada parâmetro farmacocinético e farmacodinâmico (valor populacional ou valor

típico do parâmetro), estimar o efeito da variabilidade inter-individual e de diferentes características demográficas, identificando cada efeito separadamente em cada parâmetro combinando informações de indivíduos diferentes mas ao mesmo tempo mantendo a individualidade (Schoemaker e Cohen, 1996; Ette e Williams, 2004). contribuindo para interpretações fidedígnas dos resultados. Esta técnica permite estimativas confiáveis a partir de amostragens esparsas, o que é particularmente importante para populações específicas, tais como neonatos, crianças e pacientes com doenças graves, além da possibilidade de estimar as características individuais pouco observadas ou raras na população (Aarons, 1993; Wahlby, Jonsson e Karlsson, 2001; Ette, Williams e Lane, 2004; Joerger, 2012). A qualidade das estimativas dos modelos hierárquicos não lineares de efeitos mistos é garantida através da validação da análise e da avaliação da adequação do modelo aos dados observados (Duffull *et al.*, 2005; Albers *et al.*, 2008; Piana *et al.*, 2014).

O presente estudo propõe o uso de um modelo hierárquico não linear de efeitos mistos para avaliar a disposição cinética e o metabolismo populacional dos enantiômeros do carvedilol, assim como a relação PK-PD, em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2. As concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol empregadas nos estudos de farmacocinética e PK-PD, assim como os dados de frequência cardíaca, são oriundos da Casuística e Métodos descrita no Capítulo 2.

2. Objetivos

Avaliar a disposição cinética, o metabolismo dos enantiômeros do carvedilol e a relação PK-PD populacional em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

3. Casuística e métodos

A Casuística, o protocolo clínico e as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol, provenientes da administração oral de dose única de 25 mg de carvedilol racêmico aos voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2, estão descritos no Capítulo 2. Ressalta-se que o paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2, classificado como metabolizador lento do CYP2D6 (ocasião 4; tabela 9 apresentada no capítulo 2)

também foi incluído no modelo farmacocinético populacional. Os dados de frequência cardíaca no repouso e durante o exercício isométrico com o *handgrip* foram obtidos conforme descrito no Protocolo clínico do Capítulo 2.

4. Modelo farmacocinético populacional

A análise farmacocinética populacional foi desenvolvida por modelo não linear de efeitos mistos, empregando o programa NONMEM v.7.2 (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA), no modo de estimação condicional de primeira ordem com a opção de iteração (FOCE-I; *first-order conditional estimation with the interaction option*) (Schoemaker e Cohen, 1996; Ribbing, 2007; Bauer, 2011) com compilador GNU Fortran 4.6 (Free Software Foundation, Inc.) e interface PsN (*Perl-speaks-NONMEM*, Universidade de Uppsala, Suécia), versão 3.5.3 (Lindbom, Pihlgren e Jonsson, 2005). O programa R: *A language and environment for statistical computing*, versão 3.1.2 (R foundation for statistical computing, Vienna, Áustria, 2014) foi utilizado para a reorganização do conjunto de dados, análise estatística e elaboração de gráficos de diagnóstico visual do modelo.

O modelo farmacocinético populacional foi desenvolvido na University College London, Londres, Reino Unido, sob a supervisão do Prof. Oscar Della Pasqua, com auxílio CAPES, no período maio de 2014 a janeiro de 2015.

4.1 Modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol na administração intravenosa

Uma meta-análise foi conduzida para permitir o acesso aos dados de concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol, reportados por Neugebauer et al. (1990), na administração intravenosa de 12,5 mg do fármaco racêmico a voluntários sadios. Os dados de concentrações plasmáticas obtidos nesta meta-análise foram posteriormente utilizados no desenvolvimento do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos.

A mediana e os quartis das concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol apresentadas no referido estudo foram copiadas com auxílio do programa TecDig versão 2.0 (figura 15). As medianas foram usadas para obter um modelo não linear empregando o programa NONMEM com a finalidade de descrever o perfil farmacocinético e estimar o erro residual.

Figura 15: (A) Gráfico original do estudo de Neugebauer et al. (1990). Mediana e percentis das concentrações vs tempo após infusão de 12,5 mg de carvedilol racêmico durante 1h. (B) Reprodução dos dados extraídos do estudo de Neugebauer et al. (1990).

Os critérios estatísticos de aceitação do modelo incluíram (i) minimização bem sucedida, (ii) valores de desvio padrão das estimativas (iii) número de dígitos significativos, (iv) determinação bem sucedida da covariância (v) nível de correlação entre os parâmetros do modelo e (vi) valores de gradiente da última iteração (Duffull *et al.*, 2005; Piana *et al.*, 2014).

Os efeitos fixos e aleatórios foram introduzidos ao modelo um a um em forma progressiva. Foram explorados modelos estruturais mono e bi compartimentais com absorção, distribuição e eliminação de primeira ordem para ambos os enantiômeros do carvedilol. O erro residual (ε), que compreende erros na quantificação e demais medidas, foi explorado por modelos aditivo, proporcional ou combinado (Sheiner e Ludden, 1992; Schoemaker e Cohen, 1996; Fisher e Shafer, 2007; Ribbing, 2007).

O perfil farmacocinético das medianas das concentrações plasmáticas de ambos os enantiômeros do carvedilol apresentadas em Neugebauer et al., 1990 foi melhor descrito por modelo estrutural bicompartimental com absorção, distribuição e eliminação de primeira ordem (figura 16 e equação 1) e modelo do erro residual proporcional (equação 2).

Figura 16: Esquema do modelo estrutural bicompartimental dos enantiômeros do carvedilol na infusão iv de 12,5 mg do fármaco racêmico durante 1h.

S1 e R1: Compartimento central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. S2 e R2: Compartimento periférico do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. CL_s e CL_r *clearances* do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. Q_s e Q_r: *clearance* intercompartimental do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V1s e V1r: Volume de distribuição central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2s e V2r: Volume de distribuição periférico.

$$\frac{dA_{S1}}{dt} = -\frac{CL_s}{V1s} \cdot A_{S1} - \frac{Q_s}{V1s} \cdot A_{R1} + \frac{Q_s}{V2s} \cdot A_{S2} \quad \mathbf{A}$$

$$\frac{dA_{S2}}{dt} = \frac{Q_s}{V1s} \cdot A_{S1} - \frac{Q_s}{V2s} \cdot A_{S2} \quad \mathbf{B}$$

$$\frac{dA_{R1}}{dt} = -\frac{CL_r}{V1r} \cdot A_{R1} - \frac{Q_r}{V1r} \cdot A_{R1} + \frac{Q_r}{V2r} \cdot A_{R2} \quad \mathbf{C}$$

$$\frac{dA_{R2}}{dt} = \frac{Q_r}{V1r} \cdot A_{R1} - \frac{Q_r}{V2r} \cdot A_{R2} \quad \mathbf{D}$$

Equação 1: Modelo estrutural bicompartimental dos enantiômeros do carvedilol na infusão iv de 12,5 mg do fármaco racêmico durante 1h.

A e B: Derivadas do (S)-(-)-carvedilol nos compartimentos central e periférico. **C e D:** Derivadas do (R)-(+)-carvedilol nos compartimentos central e periférico. A_{S1} e A_{R1}: quantidade de (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol no compartimento central. A_{S2} e A_{R2}: quantidade de (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol no compartimento periférico. CL_s e CL_r *clearance* do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. Q_s e Q_r: *clearance* intercompartimental do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, V1s e V1r: Volume de distribuição central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2s e V2r: Volume de distribuição periférico do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol.

$$Y_{ij} = F_{ij} + F_{ij} \cdot \epsilon_{ij}$$

Equação 2: Modelo da variabilidade residual por modelo proporcional dos enantiômeros do carvedilol.

Y_{ij}: concentrações observadas em cada indivíduo. F_{ij}: concentrações previstas em cada indivíduo e ε_{ij}: Erro residual individual de cada concentração observada (variável aleatória com distribuição normal centralizada em zero e variancia σ²).

A qualidade do ajuste do modelo aos dados de mediana das concentrações plasmáticas foi avaliada por métodos gráficos e comparações dos valores da função objetiva (OFV) e valores de variância do erro residual (σ^2), assumindo que os valores de ambos os critérios diminuem à medida que a qualidade do ajuste melhora (Piana *et al.*, 2014). A figura 17 mostra o perfil farmacocinético das medianas das concentrações previstas pelo modelo hierárquico frente as medianas observadas, mostrando boa adequação do modelo aos dados.

Nesta fase foram avaliados apenas os efeitos fixos (parâmetros) e a variância associada ao erro residual (σ^2), apresentados na tabela 18.

Figura 17: Perfil farmacocinético das concentrações preditas pelo modelo (medianas) e das concentrações observadas (medianas) a partir da infusão iv de 12,5 mg do carvedilol racêmico durante 1h (Neugebauer *et al.*, 1990).

A: escala natural. **B:** escala monolog. Linha: mediana das concentrações preditas vs tempo. Ponto: Mediana das cocentrções observadas vs tempo.

Tabela 18: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol e variância do erro residual (σ^2) do modelo parcial.

Fármaco	Parâmetro	Valor	σ^2
(S)-(-)-carvedilol	CL _S (L/h)	4,98e+01	1,47e-02
	V1s (L)	1,61e+01	
	Q _S (L/h)	6,77e+01	
	V2s (L)	5,17e+01	
(R)-(+)-carvedilol	CL _R (L/h)	3,83e+01	
	V1r (L)	1,49e+01	
	Q _R (L/h)	7,27e+01	
	V2r (L)	5,01e+01	

CL_S e CL_R *clearance* do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. Q_S e Q_R: *clearance* intercompartimental do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, V1s e V1r: Volume de distribuição central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2s e V2r: Volume de distribuição periférico. σ^2 : variância da variabilidade residual do modelo.

Posteriormente, a variabilidade inter-individual (η) foi introduzida a este modelo parcial. Para tanto, a variância associada à variabilidade inter-individual (ω^2) foi calculada usando a mediana e o intervalo da distribuição amostral dos parâmetros reportados por Neugebauer et. al. (1990) (reproduzidos na tabela 19). Inicialmente, foram calculados o desvio padrão empregando os limites do intervalo e a mediana dos parâmetros farmacocinéticos de acordo com a equação 3 (Hozo, Djulbegovic e Hozo, 2005). Em seguida, a ω^2 foi calculada ponderando o desvio padrão do parâmetro por sua média (equação 4), sendo a média obtida pela equação 5. Os valores de desvios padrão (S) e ω^2 obtidos estão apresentados na tabela 19.

$$S = \sqrt{\left(\frac{(a-2m+b)^2}{4} + (b-a)^2\right)/12}$$

Equação 3: **S:** Desvio padrão. **a:** Limite inferior da distribuição, **b:** Limite superior da distribuição e **m:** Mediana (Hozo, Djulbegovic e Hozo, 2005).

$$\left(\frac{S}{M}\right)^2 = \omega^2$$

Equação 4: ω^2 : Variância associada a variabilidade inter-individual dos parâmetros. **S:** Desvio padrão. **M:** Média (Sheiner e Beal, 1981; Fisher e Shafer, 2007; Ribbing, 2007).

$$M = \frac{a+2m+b}{4}$$

Equação 5: M: média. a e b: limite inferior e superior da distribuição, m: mediana (Hozo, Djulbegovic e Hozo, 2005)

Tabela 19: Cálculo da variância associada à variabilidade inter-individual (η) a partir dos dados de administração intravenosa do carvedilol (Neugebauer *et al.*, 1990).

Parâmetro	Mediana	a	b	S	Média	ω^2
CL _R (L/h)	36,3	18,6	44,82	7,684164	34,01	0,05106
CL _S (L/h)	39,72	34,92	51,48	4,884875	41,46	0,01388
V _R	170	103	251	42,77168	173,50	0,06077
V _S	188	105	284	51,70691	191,25	0,07310
AUC _R	172	139	325	56,41808	202,00	0,07801
AUC _S	129	76	178	29,45052	128,00	0,05294

a e **b**: Limites inferiores e limites superiores da dispersão amostral dos parâmetros farmacocinéticos apresentados por Neugebauer *et al.*, (1990). **S**: desvio padrão calculado pela equação 3. ω^2 : variância da variabilidade inter-individual calculada com a equação 4. CL_S e CL_R *clearance* do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V_S e V_R: Volume de distribuição do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. AUC_S e AUC_R: Area sob a curva concentração plasmática vs tempo do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol.

A seguir, foram realizadas 1000 simulações com variabilidade inter-individual (η) de cada parâmetro avaliada uma a uma assumindo distribuição log-normal (Sheiner, Rosenberg e Marathe, 1977; Sheiner e Beal, 1981; Sheiner e Ludden, 1992; Duffull *et al.*, 2005). Os resultados de cada iteração obtida foram comparados com os dados publicados de mediana e quartis das concentrações plasmáticas vs tempo relatados por Neugebauer *et al.*, (1990) através de critérios de avaliação gráfica (VPC). (Bergstrand *et al.*, 2011).

O ajuste do modelo aos dados foi viabilizado com a inclusão da variabilidade inter-individual (modelo log-normal) apenas no *clearance* e volume de distribuição periférico para ambos os enantiômeros do carvedilol. Os valores de variância da AUC_R e da AUC_S foram associados à variabilidade inter-individual do *clearance* e os valores de variância do V_R e do V_S foram associados à variabilidade inter-individual do volume de distribuição periférico como apresentado na tabela 20 e na equação 5.

Tabela 20: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol, variância do erro residual σ^2 e da variabilidade inter-individual ω^2 do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol na administração iv.

Fármaco	Parâmetro	Valor	ω^2	σ^2
(S)-(-)-carvedilol	CL _S (L/h)	4,98e+01	0,05294	1,47e-02
	V1 _s (L)	1,61e+01		
	Q _S (L/h)	6,77e+01		
	V2 _s (L)	5,17e+01	0,07310	
(R)-(+)-carvedilol	CL _R (L/h)	3,83e+01	0,07801	
	V1 _r (L)	1,49e+01		
	Q _R (L/h)	7,27e+01		
	V2 _r (L)	5,01e+01	0,06077	

CL_S e CL_R: *clearance* populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. Q_S e Q_R: *clearance* intercompartimental populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, V1_s e V1_r: Volume de distribuição central populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2_s e V2_r: Volume de distribuição periférico populacional. ω^2 : Variância da variabilidade inter-individual do CLs, CLr, V2s, V2r. σ^2 : variância do erro residual do modelo.

$$CL_{Ri} = CL_R \cdot e^{\eta}$$

$$CL_{Si} = CL_S \cdot e^{\eta}$$

$$V2_{Ri} = V2_R \cdot e^{\eta}$$

$$V2_{Si} = V2_S \cdot e^{\eta}$$

$$Q_{Ri} = Q_R$$

$$Q_{Si} = Q_S$$

$$V1_{Ri} = V1_R$$

$$V1_{Si} = V1_S$$

Equação 6: Modelo dos parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do carvedilol.

CL_{Si} e CL_{Ri}: *Clearance* individual do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2_{Ri} e V2_{Si}: Volume de distribuição periférico individual, V1_{Ri} e V1_{Si}: Volume de distribuição central individual, Q_{Ri} e Q_{Si}: *Clearance* intercompartimental individual. CL_S e CL_R: *clearance* populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. Q_S e Q_R: *clearance* intercompartimental populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, V1_S e V1_R: Volume de distribuição central populacional do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. V2_S e V2_R: Volume de distribuição periférico populacional. η é uma variável aleatória relacionada à variabilidade inter-individual com variância ω^2 .

A verificação visual preditiva do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol na administração intravenosa, apresentado na figura 18, permite identificar sua adequação aos dados ao mostrar simultaneamente as medianas e os quartis das concentrações plasmáticas observadas vs tempo no estudo de Neugebauer et al. (1990) com as medianas e quartis das concentrações simuladas pelo modelo. A proximidade das medianas e quartis indica que o modelo descreve as concentrações dos enantiômeros do carvedilol observadas.

Figura 18: Verificação Visual Preditiva (VPC) do modelo farmacocinético populacional dos enantiômeros do carvedilol a partir de infusão de 6,25 mg de cada enantiômero do carvedilol durante 1h. (A) escala natural, (B) escala mono-log.

Finalmente, para refletir a variabilidade na disposição cinética na população, os valores referentes a 13 percentis (0,025, 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90, 0,95, 0,975) provenientes da simulação (pelo modelo ajustado aos dados da administração intravenosa de 6,25 mg de cada enantiômero de carvedilol) foram integrados aos dados da administração oral obtidos no presente estudo para uma análise conjunta da disposição cinética dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos (figura 19).

Figura 19: Percentis das concentrações dos enantiômeros do carvedilol vs tempo oriundos da simulação da infusão iv de 6,25 mg de cada enantiômero do carvedilol durante 1h (NEUGEBAUER et al., 1990).

4.2 Modelo populacional dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos

O modelo hierárquico não linear de efeitos mistos com os dados combinados foi elaborado empregando o NONMEM v.7.2 para descrever as concentrações plasmáticas dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos vs tempo. Os critérios de elaboração incluíram os mesmos apresentados no item 3.2.1. Os efeitos fixos e aleatórios foram introduzidos no modelo um a um de forma progressiva, como se segue (Duffull *et al.*, 2005; Piana *et al.*, 2014).

Foram examinados para ambos os enantiômeros do carvedilol os modelos estruturais com múltiplos compartimentos com absorção, distribuição e eliminação de primeira ordem, com ou sem *lag-time* de absorção. Assumiu-se que o (R)-(+)-carvedilol forma o (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol e o mesmo para os antípodas (S)-(-). A variabilidade inter-individual dos parâmetros farmacocinéticos foi avaliada como normal ou log-normal e o erro residual avaliado por modelo aditivo, proporcional ou combinado (Sheiner, Rosenberg e Marathe, 1977; Sheiner e Beal, 1981; 1983; Sheiner e Ludden, 1992; Schoemaker e Cohen, 1996; Fisher e Shafer, 2007; Ribbing, 2007).

A qualidade do ajuste do modelo hierárquico aos dados foi avaliada por métodos gráficos (*goodnes of fit* - GOF), incluindo predições individuais e populacionais vs concentrações observadas, resíduos condicionais ponderados vs concentrações observadas e tempo (anexo, figura 25). As comparações entre os modelos hierárquicos compreenderam, além dos gráficos GOF, os valores da função objetiva (OFV-*objective function value*), do σ^2 e do ω^2 (Schoemaker e Cohen, 1996; Duffull *et al.*, 2005; Piana *et al.*, 2014).

O efeito do peso, IMC, idade, *clearance* de creatinina, glicemia de jejum e glicemia glicada (características medidas como variáveis contínuas) aos parâmetros farmacocinéticos foram avaliadas como covariáveis contínuas. Primeiramente as medidas individuais foram normalizadas pela mediana (os valores individuais foram divididos pela mediana de toda a amostra) e então exploradas como covariáveis por modelo aditivo, proporcional, exponencial ou alométrico que foram incluídos ao modelo um a um de forma progressiva como se segue: As covariáveis foram introduzidas ao modelo hierárquico uma a uma e a covariável que apresentou o maior declínio do valor da função objetiva foi mantida no modelo e o processo repetido

novamente até que melhorias no modelo não fossem mais encontradas, sendo que uma covariável foi considerada aprimorar o modelo se diminuísse o valor da função objetiva em ao menos 3,84 (o que representa $p < 0,05$). A seguir, as covariáveis foram removidas uma a uma, permanecendo no modelo apenas aquelas que apresentaram declínio no valor da função objetiva em ao menos 7,8 ($p < 0,005$). (Maitre *et al.*, 1991; Wahlby, Jonsson e Karlsson, 2001; 2002; Ribbing e Jonsson, 2004; Albers *et al.*, 2008; Joerger, 2012; Piana *et al.*, 2014; Retlich *et al.*, 2015).

O efeito da comedicação com glibenclamida e metformina, do diabetes *mellitus* tipo 2 e do fenótipo do CYP2D6 (condições medidas como variáveis categóricas) foram avaliados como parâmetros distintos a cada condição pelo mesmo procedimento de inclusão um a um de forma progressiva relatado para as covariáveis contínuas.

A possível influência de outras características individuais (TGO, TGP, e demais exames bioquímicos de avaliação hepática, renal e metabólica) foram primeiramente exploradas por métodos gráficos (correlação linear entre a variável e os valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos), sendo aquelas com ao menos leve correlação também experimentadas como possíveis covariáveis contínuas no modelo pelo mesmo procedimento de inclusão um a um de forma progressiva.

4.3 Avaliação e validação do modelo final

O modelo farmacocinético populacional foi validado por métodos gráficos e estatísticos. A verificação visual preditiva (VPC - *visual predictive check*) foi obtida a partir de 1000 simulações de concentração plasmáticas vs tempo para cada indivíduo conduzidas pelo modelo. A mediana e os percentis 5% e 95% dos dados simulados foram plotados juntamente com os mesmos percentis dos dados observados (anexo, figuras 29 e 30) com o objetivo de visualmente avaliar a adequação do modelo aos dados clínicos, sua precisão, a variabilidade da simulação e o desempenho preditivo do modelo (Bergstrand *et al.*, 2011).

A verificação visual preditiva posterior (*posterior predictive check*, PPC) foi verificada a partir de outras 1000 simulações de concentração plasmáticas vs tempo para cada indivíduo conduzidas pelo modelo. Os valores de AUC dos dados simulados foram calculados e os histogramas de frequências foram plotados juntamente com as medianas dos valores de AUC dos dados clínicos observados para ambos os enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol (anexo,

figuras 31 a 33), originando informações sobre o ajuste do modelo aos dados clínicos (Yano, Beal e Sheiner, 2001).

O poder preditivo do modelo também foi avaliado pelo cálculo da distribuição dos erros de predição normalizada (NPDE - *normalized prediction distribution errors*), realizados pela biblioteca NPDE versão 2.0 do programa R. Foram plotados os gráficos dos valores de NPDE vs concentrações preditas e tempo que informam a presença ou não de distorções nos resultados. O histograma de frequência e o gráfico quantil-quantil (Q-Q plot) também foram gerados para informar a tendência de distribuição normal dos erros (anexo, figuras 34 a 36) (Comets, Brendel e Mentre, 2008).

O gráficos espelhos que tem por finalidade avaliar o grau de similaridade entre os dados originais e os dados simulados a partir do modelo final também foram realizados para a avaliação do modelo. Foram realizadas 10 simulações, das quais 5 foram escolhidas de forma aleatória e comparadas aos dados originais por gráficos de predições individuais e populacionais vs concentrações observadas; resíduos condicionais ponderados vs concentrações observadas e tempo. (anexo, figuras 26 a 28) (Zhao *et al.*, 2013; Piana *et al.*, 2014).

O *bootstrap* (Parke, Holford e Charles, 1999; Yafune e Ishiguro, 1999; Lindbom, Pihlgren e Jonsson, 2005; Dowd, Pardo-Iguzquiza e Egozcue, 2015) foi realizado para avaliar numericamente vieses, estabilidade, precisão e reprodutibilidade das estimativas feitas pelo modelo. Foram criados outros 1000 conjuntos de dados por amostragens de indivíduos a partir do conjunto de dados clínicos observados com reposição (os indivíduos amostrados são repostos ao conjunto de dados clínicos observados que não é modificado), com os quais 1000 estimativas dos parâmetros foram conduzidas pelo modelo possibilitando a obtenção da mediana, percentis e coeficientes de variação dos parâmetros pelo teste do *bootstrap*. Estes valores são comparados com os percentis da distribuição amostral das estimativas dos parâmetros individuais e com as estimativas populacionais dos parâmetros pelo modelo a partir dos dados clínicos observados. O teste do *bootstrap* foi conduzido no NONMEM pela interface PsN.

4.4 Avaliação farmacocinética - farmacodinâmica

Para a avaliação da relação farmacocinética-farmacodinâmica foram utilizados os valores da variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico

utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima (diferença da frequência cardíaca entre os períodos de repouso e o período do exercício), como descrito no Capítulo 2. O aumento da frequência cardíaca induzido pelo exercício isométrico foi avaliado em função das concentrações plasmáticas populacionais e individuais preditas para a identificação do modelo mais apropriado para descrever a redução do aumento da frequência cardíaca induzido pelo exercício isométrico durante 2 min com o *handgrip*.

5. Resultados

Os dados de concentração plasmática dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos vs tempo obtidos para os voluntários sadios e para os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 foram descritos por modelo estrutural multicompartmental com absorção, distribuição e eliminação de primeira ordem e sem *lag-time* de absorção, como representado na figura 20 e equação 7.

As concentrações plasmáticas vs tempo dos enantiômeros do hidroxfenilcarvedilol (CYP2D6) e O-desmetilcarvedilol (CYP2C9) foram empregadas como marcadores da eliminação dos enantiômeros do carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9 permitindo a obtenção dos *clearances* dos enantiômeros do carvedilol pelo CYP2D6 (CL_{R2D6} , CL_{S2D6}) e CYP2C9 (CL_{S2C9} e CL_{R2C9}).

Figura 20: Esquema do modelo estrutural dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos.

1 e 6 compartimentos de depósito da dose do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol; 2, 7, 4, 9, 5 e 10 compartimento central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol; (S)-(-) e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol; (S)-(-) e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. 3 e 8 compartimentos periféricos do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. CL_{S2D6} e CL_{S2C9} *clearance* do (S)-(-)-carvedilol pelo CYP2D6 (formando o (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol) e CYP2C9 (formando o (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol). CL_{R2D6} e CL_{R2C9} *clearance* do (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 (formando o (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol) e CYP2C9 (formando o (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol). FS e FR: biodisponibilidade do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. KAS e KAR: constante de absorção do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. CL20 e CL70: *clearance* por outras vias metabólicas do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. QS e QR *clearance* intercompartimental do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol. CL_{S-OH} e CL_{R-OH} : *clearance* do (S)-(-) e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol. CL_{S-DM} e CL_{R-DM} : *clearance* do (S)-(-) e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. V2, V7, V4, V9, V5 e V10: Volume de distribuição central do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol; (S)-(-) e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-) e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. V3 e V8 volume de distribuição periférico do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol.

$$\mathbf{As} \quad \frac{dA1}{dt} = -KAS \cdot A1$$

$$\mathbf{Bs} \quad \frac{dA2}{dt} = KAS \cdot A1 - \frac{CL_{20}}{V2} \cdot A2 - \frac{QS}{V2} \cdot A2 + \frac{QS}{V3} \cdot A3 - \frac{CL_{S2D6}}{V2} \cdot A2 - \frac{CL_{S2C9}}{V2} \cdot A2$$

$$\mathbf{Cs} \quad \frac{dA3}{dt} = \frac{QS}{V2} \cdot A2 - \frac{QS}{V3} \cdot A3$$

$$\mathbf{Ds} \quad \frac{dA4}{dt} = \frac{CL_{S2D6}}{V2} \cdot A2 - \frac{CL_{S-OH}}{V4} \cdot A4$$

$$\mathbf{Es} \quad \frac{dA5}{dt} = \frac{CL_{S2C9}}{V2} \cdot A2 - \frac{CL_{S-DM}}{V5} \cdot A5$$

$$\mathbf{Ar} \quad \frac{dA6}{dt} = -KAR \cdot A6$$

$$\mathbf{Br} \quad \frac{dA7}{dt} = KAR \cdot A6 - \frac{CL_{70}}{V7} \cdot A7 - \frac{QR}{V7} \cdot A7 + \frac{QR}{V8} \cdot A8 - \frac{CL_{R2D6}}{V7} \cdot A7 - \frac{CL_{R2C9}}{V7} \cdot A7$$

$$\mathbf{Cr} \quad \frac{dA8}{dt} = \frac{QR}{V7} \cdot A7 - \frac{QR}{V8} \cdot A8$$

$$\mathbf{Dr} \quad \frac{dA9}{dt} = \frac{CL_{R2D6}}{V7} \cdot A7 - \frac{CL_{R-OH}}{V9} \cdot A9$$

$$\mathbf{Er} \quad \frac{dA10}{dt} = \frac{CL_{R2C9}}{V7} \cdot A7 - \frac{CL_{R-DM}}{V10} \cdot A10$$

Equação 7: Modelo estrutural dos enantiômeros do carvedilol e metabólitos.

As e **Ar**: Derivadas do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol no trato gastrointestinal. **Bs** e **Br**: (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol no compartimento central. **Cs** e **Cr**: (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol no compartimento periférico. **Dr** e **Ds**: (S)-(-)- e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol no compartimento central. **Es** e **Er**: (S)-(-)- e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol no compartimento central.

A1 e A6 quantidade (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol no trato gastrointestinal; A2, A7, A4, A9, A5 e A10 quantidade de (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol; (S)-(-)- e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-)- e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol no compartimento central. A3 e A8 quantidade de (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol no compartimento periférico. V2, V7, V4, V9, V5 e V10: volume de distribuição central do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol; (S)-(-)- e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-)- e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. V3 e V8 volume de distribuição periférico do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. CL_{S2D6} e CL_{S2C9} *clearance* do (S)-(-)-carvedilol pelo CYP2D6 (formando e (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol) e CYP2C9 (formando (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol). CL_{R2D6} e CL_{R2C9} *clearance* do (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 (formando e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol) e CYP2C9 (formando (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol). KAS e KAR: constante de absorção do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. CL₂₀ e CL₇₀: *clearance* por outras vias metabólicas do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. QS e QR *clearance* intercompartimental do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. CL_{S-OH} e CL_{R-OH}: *clearance* do (S)-(-)- e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol. CL_{S-DM} e CL_{R-DM}: *clearance* do (S)-(-)- e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol.

O modelo proporcional ($Y = F + F \cdot \varepsilon$) descreve a variabilidade residual, na qual Y é cada concentração observada por indivíduo, F é cada concentração predita por indivíduo e ε é uma variável aleatória com média 0 variância σ^2 e a estimativa de σ^2 esta na tabela 22. A variabilidade inter-individual possui distribuição log-normal em todos os parâmetros: $\text{Parâmetro}_{\text{individual}} = \text{Parâmetro}_{\text{populacional}} \cdot e^{\eta}$, na qual $\text{parametro}_{\text{individual}}$ são os valores individuais dos parâmetros, $\text{parametro}_{\text{populacional}}$ é o valor característico da população para o parametro e η é uma variável aleatória com média 0 variância ω^2 exceto para os *clearances* ($\text{CL}_{\text{S-OH}}$, $\text{CL}_{\text{R-OH}}$, $\text{CL}_{\text{S-DM}}$ e $\text{CL}_{\text{R-DM}}$) e volume de distribuição central (V_4 , V_5 , V_9 e V_{10}) dos enantiômeros de ambos os metabólitos que não incluem variabilidade inter-individual ($\text{Parâmetro}_{\text{individual}} = \text{Parâmetro}_{\text{populacional}}$). A estimativa de ω^2 de cada parametro estão nas tabelas 21 e 22.

Não foi observado efeito das características avaliadas como covariáveis nos parâmetros farmacocinéticos, apenas o diabetes mellitus tipo 2 e o fenótipo do CYP2D6 (que foram avaliados como parâmetros distintos) apresentaram efeito nos clearances do carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9 (CL_{R2D6} , CL_{S2D6} e CL_{S2C9} , CL_{R2C9}) de forma que os estes clearances possuem valores distintos para os indivíduos saudáveis EM, portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 EM e PM (tabela 21 e 22).

O resultado do *bootstrap* está apresentado nas tabelas 21 e 22 juntamente com as estimativas populacionais dos parâmetros e das variâncias ω^2 e σ^2 pelo modelo hierárquico. O intervalo de percentil, o coeficiente de variação e a proximidade da mediana das 1000 estimativas dos parâmetros pelo *bootstrap* com o valor previsto pelo modelo hierárquico final fornecem informações numéricas de sua precisão e capacidade preditiva. Dentre as 1000 estimativas conduzidas pelo teste, 960 foram bem sucedidas.

As figuras 21 a 23 e as tabelas 21 e 22 mostram os valores de *clearance* dos enantiômeros do carvedilol pelo CYP2D6 (CL_{S2D6} e CL_{R2D6}), CYP2C9 (CL_{S2C9} e CL_{R2C9}) e por outras vias metabólicas (CL_{20} e CL_{70}). Apresentam ainda os valores de *clearance* total ($\text{CL}_{\text{S}} = \text{CL}_{70} + \text{CL}_{\text{R2D6}} + \text{CL}_{\text{R2C9}}$ e $\text{CL}_{\text{R}} = \text{CL}_{20} + \text{CL}_{\text{S2D6}} + \text{CL}_{\text{S2C9}}$), a biodisponibilidade (FS e FR) e os volumes de distribuição central e periférico dos enantiômeros do carvedilol, hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol.

Para a avaliar as diferenças entre os parâmetros do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol foi empregado o teste t de Student com significância de 5% e poder de 80%.

Tabela 21: Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos, variâncias associadas à variabilidade inter-individual (ω^2) e resultados do *bootstrap* para o (S)-(-)-carvedilol, (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol.

	Parâmetro	Estimativa (95% percentil)		Bootstrap mediana (95% percentil)		CV%	ω^2	Bootstrap mediana (95% percentil)		CV%
(S)-(-)-carvedilol	KAS (h ⁻¹)	0,976	(0,55 - 1,21)	0,952	(0,71 - 1,25)	14,07	0,249	0,298	(0,07 - 0,42)	31,21
	CL20 (L/h)	28,2	(17,92 - 46,11)	28,95	(12,16 - 44,15)	28,66	0,153	0,098	(0,06 - 0,25)	42,53
	FS (%)	16,43	(7,8 - 19,8)	16,14	(10,27 - 21,70)	22,93	0,234	0,193	(0,08 - 0,39)	35,08
	V2 (L)	35,9	(18,52 - 90,84)	34,21	(27,38 - 87,10)	26,65	0,292	0,293	(0,14 - 0,55)	44,45
	QS (L/h)	46,9	(31,37 - 61,07)	46,35	(34,79 - 58,97)	13,75	0,106	0,064	(0,05 - 0,22)	33,87
	V3 (L)	105	(52,33 - 164,46)	106,91	(45,03 - 160,54)	43,49	0,548	0,518	(0,33 - 0,76)	21,04
	CL _s 2D6 (L/h)	(S_EM) 1,65	(0,83 - 2,87)	1,46	(0,19 - 2,79)	32,87	0,517	0,462	(0,18 - 0,85)	36,98
		(D_EM) 7,28	(0,98 - 19,57)	6,91	(1,54 - 15,33)	35,76				
		(D_PM) 0,49		0,41	(0,07 - 0,8)	33,57				
	CL _s 2C9 (L/h)	(S_EM) 16,2	(8,09 - 37,05)	16,17	(5,98 - 28,40)	37,03	0,274	0,223	(0,18 - 0,37)	21,40
		(D_EM) 7,71	(2,30 - 16,12)	6,83	(0,61 - 12,95)	28,00				
		(D_PM) 13,88		13,74	(5,91 - 22,32)	31,77				
	CLS (L/h) (CL20 + CL _s 2D6 + CL _s 2C9)	(S_EM) 46,05	(32,14 - 78,10)	45,98	(32,18 - 68,94)	22,99	--	--	--	--
		(D_EM) 43,19	(27,85 - 68,90)	43,14	(29,62 - 61,07)	22,74				
		(D_EM) 42,57		42,08	(32,94 - 55,19)	13,74				
(S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol	CL _s -OH (L/h)	40,3		32,88	(16,12 - 64,41)	44,78	--	--	--	--
	V4 (L)	7,15		4,94	(2,42 - 11,87)	50,02	--	--	--	--
(S)-(-)-O-desmetilcarvedilol	CL _s -DM (L/h)	139		126,96	(44,04 - 247,53)	40,73	--	--	--	--
	V5 (L)	27,9		25,28	(8,12 - 47,64)	38,21	--	--	--	--

V2, V4 e V5: Volume de distribuição central do (S)-(-)-carvedilol, (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol e (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol, respectivamente. V3: volume de distribuição periférico do (S)-(-)-carvedilol. FS: biodisponibilidade do (S)-(-)-carvedilol. CL_s2D6 e CL_s2C9 *clearance* do (S)-(-)-carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9. (**S_EM**): Voluntários sadios metabolizadores rápidos do CYP2D6. (**D_EM**): Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento metabolizadores rápidos do CYP2D6. (**D_PM**): Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento metabolizador lento do CYP2D6. CL20: *Clearance* por outras vias metabólicas do (S)-(-)-carvedilol. CLS: *Clearance* total do (S)-(-)-carvedilol (CL20 + CL_s2D6 + CL_s2C9), KAS: Constante de absorção do (S)-(-)-carvedilol. QS: *Clearance* intercompartimental do (S)-(-)-carvedilol. CLS-OH: *Clearance* do (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol. CLS-DM: *Clearance* do (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol. ω^2 : Variância de η .

Tabela 22: Estimativas dos parâmetros farmacocinéticos, variâncias associadas à variabilidade inter-individual (ω^2) e resultados do *bootstrap* para o (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol.

	Parâmetro	Estimativa (95% percentil)		Bootstrap mediana (95% percentil)		CV%	ω^2	Bootstrap mediana (95% percentil)		CV%
(R)-(+)-carvedilol	KAR (h^{-1})	0,867	(0,59 - 1,5)	0,880	(0,71 - 1,02)	8,79	0,125	0,149	(0,11 - 0,27)	48,49
	CL70 (L/h)	4,86	(3,09 - 7,95)	5,60	(1,43 - 8,94)	24,20	0,025	0,027	(0,01 - 0,08)	12,80
	FR (%)	25,4	(18,1 - 30,2)	24,85	(20,01 - 33,19)	33,19	0,178	0,163	(0,03 - 0,32)	44,76
	V7 (L)	21,1	(6,84 - 69,68)	21,11	(11,22 - 70,03)	38,21	0,670	0,501	(0,20 - 1,14)	45,02
	QR (L/h)	28,5	(8,541 - 43,42)	28,88	(11,13 - 35,85)	23,08	0,701	0,529	(0,19 - 1,41)	40,09
	V8 (L)	97,5	(58,16 - 141,95)	97,77	(60,69 - 146,79)	38,88	0,179	0,107	(0,25 - 0,33)	36,16
	CL _R 2D6 (L/h)	(S_EM) 2,69	(1,65 - 3,95)	2,57	(1,08 - 7,61)	29,69	0,126	0,108	(0,06 - 0,19)	31,28
		(D_EM) 13,7	(6,50 - 28,03)	13,35	(7,46 - 23,29)	27,45				
		(D_PM) 0,46		0,53	(0,06 - 1,94)	46,63				
	CL _R 2C9 (L/h)	(S_EM) 25,6	(13,84 - 55,05)	26,24	(19,34 - 49,69)	32,31	0,286	0,208	(0,08 - 0,50)	46,36
		(D_EM) 10,5	(3,64 - 22,73)	11,31	(1,89 - 20,49)	30,11				
		(D_PM) 24,35		25,40	(17,20 - 57,04)	28,55				
	CLR (L/h) (CL70 + CL _R 2D6 + CL _R 2C9)	(S_EM) 33,15	(17,40 - 58,51)	34,50	(17,26 - 50,11)	26,01	--	--	--	--
		(D_EM) 29,06	(16,77 - 44,13)	28,69	(13,74 - 44,34)	30,72				
		(D_PM) 29,67		33,88	(15,52 - 49,35)	26,38				
(R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol	CL _R -OH (L/h)	37,1		34,72	(22,83 - 42,81)	14,25	--	--	--	--
	V9 (L)	9,05		8,35	(5,99 - 11,39)	46,73	--	--	--	--
(R)-(+)-O-desmetilcarvedilol	CL _R -DM (L/h)	131		150,36	(35,63 - 226,24)	31,24	--	--	--	--
	V10 (L)	18,4		21,54	(5,19 - 31,61)	32,45	--	--	--	--

	Estimativa	Bootstrap mediana (95% percentil)		CV%
σ^2	0,128	0,135	(0,11 - 0,15)	7,96

V7, V9 e V10: Volume de distribuição central do (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol, respectivamente. V8: Volume de distribuição periférico do (R)-(+)-carvedilol, FR: biodisponibilidade do (R)-(+)-carvedilol. CL_R2D6 e CL_R2C9 *clearance* do (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9. (S_EM): Voluntários sadios metabolizadores rápidos do CYP2D6. (D_EM): Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento metabolizadores rápidos do CYP2D6. (D_PM): Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento metabolizador lento do CYP2D6. CL70: *Clearance* por outras vias metabólicas do (R)-(+)-carvedilol. CLR: *Clearance* total dos (R)-(+)-carvedilol (CL70 + CL_R2D6 + CL_R2C9); KAR: Constante de absorção do (R)-(+)-carvedilol e QR: *Clearance* intercompartimental do (R)-(+)-carvedilol, CL_R-OH: *Clearance* do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol e CL_R-DM: *Clearance* do (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol. ω^2 : Variância de η . σ^2 : Variância do erro residual

Figura 21: Clearance do (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9 (A) e Clearance total (B) dos enantiômeros do carvedilol.

CLR e CLS clearance total do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol (CL70 + CLr2D6 + CLr2C9 e CL20 + CLs2D6 + CLs2C9). CLr2D6 e CLs2D6 clearance do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol pelo CYP2D6. CLr2C9 e CLs2C9: clearance do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol pelo CYP2C9. Diabéticos: Pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. Voluntários: Voluntários sadios. EM: Metabolizador rápido do CYP2D6. PM: Metabolizador lento do CYP2D6

Figura 22: *Clearances* por outras vias metabólicas (A) e biodisponibilidade (B) dos enantiômeros do carvedilol.

CL70 e CL20: *clearances* por outras vias metabólicas que não CYP do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol. FR e FS: biodisponibilidade do (R)-(+)- e (S)-(-)-carvedilol. Diabéticos: Pacientes: portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. Voluntários: Voluntários saudáveis. EM: Metabolizador rápido do CYP2D6. PM: Metabolizador lento do CYP2D6

Figura 23: Volume de distribuição central e periférico dos enantiômeros do carvedilol. V2 e V7: Volume de distribuição central do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. V3 e V8: Volume de distribuição periférico do (S)-(-)- e (R)-(+)-carvedilol. Diabéticos: Pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. Voluntários: Voluntários sadios. EM: Metabolizador rápido do CYP2D6. PM: Metabolizador lento do CYP2D6

A administração de dose única de 12,5 mg de (S)-(-)-carvedilol (25 mg de carvedilol racêmico) não alterou a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico durante 2 min com o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima. A figura 24 mostra o aumento da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em função das concentrações preditas individuais e populacionais do (S)-(-)-carvedilol. Como observado, não houve dependência da variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício com a variação das concentrações populacionais preditas (figura 24 B), mesmo nas mais altas (Cmax; figura 24 C).

Figura 24: Variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício em função das concentrações preditas individuais (A), populacionais (B) e concentração plasmática máxima (Cmax) individual (C).

6. Discussão

A disposição cinética e o metabolismo populacional dos enantiômeros do carvedilol foram avaliados por modelo não linear de efeitos mistos (modelo hierárquico) que se mostrou preciso e com capacidade preditiva adequada por métodos de avaliação do ajuste do modelo aos dados (anexo) e validação. O resultado do bootstrap (Tabelas 21 e 22) mostra que as estimativas dos parâmetros a partir dos dados clínicos observados são muito próximas das geradas pelo *bootstrap* que apresentou valores adequados de CV% apesar do número baixo de indivíduos incluídos, comprovando a robustez, precisão e a confiabilidade dos valores dos parâmetros farmacocinéticos estimados populacionalmente.

A meta-análise incluindo dados de concentração plasmática dos enantiômeros do carvedilol a partir de infusão iv possibilitou a estimativa da biodisponibilidade dos enantiômeros do carvedilol, que juntamente com as concentrações plasmáticas dos enantiômeros dos metabólitos, permitiu pela primeira vez uma caracterização populacional do metabolismo dos enantiômeros do carvedilol, assim como a estimativa dos *clearances* dos enantiômeros do fármaco pelo CYP2D6 e CYP2C9 (figura 20 e equação 6).

A metabolização pré-sistêmica dos enantiômeros do carvedilol pelo CYP2D6 e CYP2C9 foi explorada introduzindo ao modelo constantes de formação dos enantiômeros dos metabólitos a partir dos enantiômeros do carvedilol no trato gastrointestinal (compartimento de depósito da dose). No entanto, estas constantes apresentaram valores próximos a zero e não contribuíram no aprimoramento do modelo. A possibilidade de interconversão quiral metabólica foi avaliada por um *clearance* intercompartimental entre os enantiômeros do carvedilol no compartimento central (compartimentos 2 e 7 da figura 20), mas este parâmetro também não contribuiu no ajuste do modelo.

Conforme comentado nos Capítulos anteriores e confirmado por estudos prévios da literatura (Eisenberg, Patterson e Kahn, 1989; Neugebauer *et al.*, 1990; Gehr *et al.*, 1999; Tenero *et al.*, 2000; Tenero *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2010; Furlong *et al.*, 2012), observa-se maiores concentrações plasmáticas dos enantiômeros (R)-(+)-carvedilol, (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol e (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol nos voluntários saudáveis e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (figuras 11 e 12 do Capítulo 2). A distribuição dos enantiômeros do carvedilol no compartimento periférico, como

mostrado na figura 20, também está de acordo com estudos da literatura (Vanmollendorff, Reiff e Neugebauer, 1987; Zhou e Wood, 1995; Tenero *et al.*, 2000; Giessmann *et al.*, 2004; Tenero *et al.*, 2006).

Os enantiômeros dos metabólitos hidroxifenilcarvedilol e O-desmetilcarvedilol, apesar da semelhança estrutural com o carvedilol inalterado, não se distribuíram no compartimento periférico (hipótese experimentada na elaboração do modelo estrutural), provavelmente devido suas baixas concentrações plasmáticas (figuras 11 e 12 do Capítulo 2) e seus *clearances* (CL_{R-OH} , CL_{S-OH} , CL_{R-DM} e CL_{S-DM}) e volumes de distribuição central (V_4 , V_5 , V_9 , V_{10}) não apresentaram variabilidade inter-individual (tabelas 21 e 22).

Os valores de biodisponibilidade estimados pelo modelo para os enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol (16,43 vs 25,4%), assim como os valores de *clearance* total (46,05 vs 33,15 L/h), são próximos aos valores relatados por Neugebauer *et al.* (1990) (biodisponibilidade 15,1% vs 31,1% e *clearance* total 39,72 vs 36,3 L/h).

Os valores de *clearance* do (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2D6 é maior que o do (S)-(-)-carvedilol para os voluntários sadios EM (2,69 vs 1,65 L/h; $p < 0,05$) e diabéticos EM em tratamento (13,7 vs 7,28 L/h; $p < 0,05$) e igualmente baixo para o diabético PM em tratamento (0,46 vs 0,49 L/h; $p > 0,05$). assim como o *clearance* do (R)-(+)-carvedilol pelo CYP2C9 é maior que o do antípoda para os voluntários sadios (25,6 vs 16,2 L/h; $p < 0,05$), portadores de diabetes EM em tratamento (10,5 vs 7,1 L/h; $p < 0,05$) e portador de diabetes PM em tratamento (24,35 vs 13,88 L/h; $p < 0,05$) (tabelas 21 e 22, figura 21). Logo o *clearance* total semelhante do (R)-(+) e (S)-(-)-carvedilol entre as 3 condições [(R)-(+): (33,15; 29,06 e 29,67) vs (S)-(-): (46,05; 43,19 e 42,57), $p > 0,05$] se deve à eliminação do carvedilol por metabolização não envolvendo CYP2D6 e CYP2C9 que possuem *clearance* muito maior para o (S)-(-)-carvedilol do que para o (R)-(+)-carvedilol (28,2 vs 4,86 L/h; $p < 0,05$; CL20 e CL70 nas tabelas 21 e 22, figura 21). Portanto as menores concentrações plasmáticas do enantiômero (S)-(-)-carvedilol se devem não apenas à sua menor biodisponibilidade [(S)-(-): 16,43 vs 25,4%, $p < 0,05$], mas também a seu maior *clearance* por outras vias de metabolismo que não CYP (CL20 e CL70) que podem ser predominantemente a glicuronidação. Os valores estimados de *clearance* por outras vias metabólicas estão de acordo com relatos anteriores de que o (S)-(-)-carvedilol é principalmente metabolizado por glicurunidação (Neugebauer *et al.*, 1987; Vanmollendorff, Reiff e Neugebauer, 1987; Neugebauer e

Neubert, 1991; Ohno *et al.*, 2004). Takekuma *et al.* (2007) relataram que em microsossomos de fígado humano a formação do metabólito (S)-(-)-carvedilol-glucoronídeo é aproximadamente 2 vezes maior que a formação do antípoda. Em outro estudo (Hanioka *et al.*, 2012) é relatado que a glicuronidação do (S)-(-)-carvedilol é 6 a 11 vezes maior do que a glicuronidação do (S)-(-)-carvedilol em microsossomos de fígado humano e 1,9 a 2,23 vezes em microsossomos de intestino humano. Uma possível explicação para a diferença na capacidade de glicuronidação entre os enantiômeros do carvedilol é que eles são metabolizados por diferentes isoformas da UDP-glicuronosiltransferase, o (R)-(+)-carvedilol preferencialmente metabolizado pela UGT1A1 e UGT2B4, enquanto o (S)-(-)-carvedilol pela UGT2B4 e UGT2B7 (Takekuma *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2008). A glicuronidação enantiosseletiva do carvedilol observada no presente estudo é uma das primeiras evidências, se não for a primeira, de que a glicuronidação de fármacos quirais pode ser enantiosseletiva.

Embora os *clearances* pelo CYP2D6 e CYP2C9 sejam maiores para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol do que para o (S)-(-)-carvedilol, alterações na atividade das referidas enzimas modificam os *clearances* dos enantiômeros do carvedilol no mesmo sentido, ou seja, aumentando ou diminuindo ambos. As estimativas do *clearance* pelo CYP2D6 do (S)-(-)-carvedilol foram de 1,65 vs 7,28 L/h ($p < 0,005$), para os voluntários sadios EM e para os portadores de diabetes EM, respectivamente, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 2,69 vs 13,7 L/h ($p < 0,005$). Em relação ao *clearance* pelo CYP2C9, os valores estimados para o (S)-(-)-carvedilol foram de 16,2 vs 7,71 L/h ($p < 0,005$), para os voluntários sadios EM e para os portadores de diabetes EM respectivamente, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 25,6 vs 10,5 L/h ($p < 0,005$).

Os pacientes investigados portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 faziam uso de glibenclamida (5 mg/8h), um substrato (Tirkkonen *et al.*, 2010; Surendiran *et al.*, 2011; Holstein, Beil e Kovacs, 2012) e inibidor competitivo do CYP2C9 (Kim e Park, 2003), o que provavelmente resultou na redução dos valores de *clearance* pelo CYP2C9 quando comparados aos voluntários sadios não comedificados ou comedificados com dose única de glibenclamida. Como anteriormente discutido no Capítulo 2, a influência do diabetes *mellitus* tipo 2 na redução dos valores de *clearance* pelo CYP2C9 ou no aumento dos valores de *clearance* pelo CYP2D6 é pouco provável.

Os valores de *clearance* total de ambos os enantiômeros do carvedilol não diferem entre os voluntários sadios EM (não comedicionados + comedicionados com dose única de glibenclamida e metformina) e os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento EM [(S)-(-): 46,05 vs 43,19 L/h; ($p>0,05$) e (R)-(+): 33,15 vs 29,06 L/h; ($p>0,05$)] (tabelas 20 e 21, figura 21), porque os menores *clearances* pelo CYP2C9 são compensados por maiores *clearances* pelo CYP2D6 nos portadores de diabetes EM em relação aos voluntários sadios EM (tabela 21 e 22).

O paciente portador de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento fenotipado como metabolizadores lentos para o CYP2D6 (PM) apresentaram valores baixos de *clearance* pelo CYP2D6 para ambos os enantiômeros [0,49 vs 0,46 L/h, respectivamente para (S)-(-) e (R)-(+)] quando comparados aos metabolizadores rápidos (EM) [(7,28 vs 13,70 L/h, para (S)-(-) e (R)-(+)] ($p<0,005$) (tabelas 21 e 22 e figura 21). No entanto, os pacientes diabético PM em tratamento apresentaram maiores valores de *clearance* pelo CYP2C9 [13,88 e 24,35 L/h, respectivamente para (S)-(-) e (R)-(+)] quando comparados aos diabéticos EM (7,71 e 10,50 L/h, respectivamente para (S)-(-) e (R)-(+)], ($p<0,005$) (tabelas 21 e 22 e figura 21). Logo, o *clearance* total não difere para ambos os enantiômeros do carvedilol entre os portadores de diabetes em tratamento EM [43,19 e 29,06 L/h, respectivamente para (S)-(-) e (R)-(+)] e PM (42,57 e 29,67 L/h, para (S)-(-) e (R)-(+)], ($p>0,05$) (tabelas 21 e 22 e figura 21). A observação de que o *clearance* total não difere para ambos os enantiômeros do carvedilol entre os metabolizadores rápidos e lentos do CYP2D6 está de acordo com a investigação de voluntários sadios relatada por Giessmann et al., (2004) (discussão do capítulo 2).

Concluindo, a biodisponibilidade, os volumes de distribuição e o *clearance* total de ambos os enantiômeros do carvedilol não diferem entre os voluntários sadios EM (não comedicionados e comedicionados com dose única de metformina e glibenclamida) e os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 PM ou EM. No entanto os volumes de distribuição também não diferem entre os enantiômeros do carvedilol (central: 35,9 e 21,1; periférico: 105 e 97,5; para (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol respectivamente; ($p>0,05$); figura 23 e tabela 21 e 22). Esta é uma das primeiras evidências na clínica de que a redução de uma via metabólica pode ser compensada pelo aumento de outra via metabólica e manter a o *clearance* total do fármaco inalterado. (figura 23 tabela 21 e 22)

As interpretações oriundas da análise do metabolismo e da farmacocinética populacional apresentadas neste Capítulo são semelhantes às aquelas apresentadas no Capítulo 2 empregando análise não compartimental. No entanto, a análise populacional possibilitou a estimativa dos *clearances* do carvedilol pelo CYP2C9 e CYP2D6, a estimativa da biodisponibilidade dos enantiômeros do carvedilol e a avaliação das influências do peso, IMC, idade, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, TGO, TGP, *clearance* de creatinina, diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina e fenótipo do CYP2D6 como covariáveis em cada parâmetro. Permitindo interpretações objetivas da disposição cinética e do metabolismo. Além disso a análise populacional permite validação de suas estimativas.

A administração de dose única de 12,5 mg de (S)-(-)-carvedilol (25 mg de carvedilol racêmico) não alterou a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico durante 2 min com o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima. A variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício em função das concentrações individuais preditas, observada na figura 24 A, é um reflexo da variabilidade inter-individual e não de uma correlação, pois as figuras 24 B e 24 C, respectivamente, não mostram dependência da variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício com as concentrações plasmáticas populacionais ou com os valores de C_{max} do (S)-(-)-carvedilol. Os dados permitem inferir que na dose única de 12,5 mg o (S)-(+)-carvedilol não altera a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com o *handgrip*. Kubo et al. (2001) também relatam que a administração de 25mg de carvedilol/12 h durante 4 meses não altera a resposta ao exercício isométrico durante 2 min a 30% da contratilidade voluntária máxima.

7. Conclusão

1- O modelo não linear de efeitos mistos para a análise da disposição cinética e metabolismo populacional dos enantiômeros do carvedilol é preciso e possui capacidade preditiva adequada avaliada por métodos visuais e *bootstrap* do ajuste do modelo aos dados.

2-Os valores de biodisponibilidade estimados pelo modelo para os enantiômeros (S)-(-) e (R)-(+)-carvedilol, respectivamente 16,43 e 25,4%, não diferem entre

voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

3- Os valores de *clearance* pelo CYP2D6 estimados para o (S)-(-)-carvedilol foram de 1,65 vs 7,28 L/h, respectivamente, para os voluntários sadios e para os pacientes diabéticos, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 2,69 vs 13,7 L/h. Em relação ao *clearance* pelo CYP2C9, os valores estimados para o (S)-(-)-carvedilol foram de 16,2 vs 7,71 L/h, respectivamente, para os voluntários sadios e para os pacientes diabéticos, enquanto os estimados para o enantiômero (R)-(+)-carvedilol foram de 25,6 vs 10,5 L/h. Os valores de *clearance* por outras vias metabólicas são maiores para o (S)-(-)-carvedilol do que para o (R)-(+)-carvedilol (28,2 vs 4,86 L/h) e não diferem entre voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

4- Os valores de *clearance* total de ambos os enantiômeros do carvedilol não diferem entre os voluntários sadios e os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 [(S)-(-): 46,05 vs 43,19 L/h e (R)-(+): 33,15 vs 29,06 L/h], devido os menores *clearances* do CYP2C9 serem compensados por maiores *clearances* do CYP2D6.

5- O volume de distribuição de ambos os enantiômeros do carvedilol não difere entre os voluntários sadios e os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 metabolizadores rápidos ou metabolizadores lentos e entre os enantiômeros do carvedilol.

8- A disposição dos enantiômeros do carvedilol não é diferente nos portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 ou influenciada pelo fenótipo do CYP2D6.

9- Assumindo que o tratamento com carvedilol é eficaz na proteção cardíaca, pode-se inferir que não é necessário ajuste de dose na diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida ou metformina quando bem controlada e na ausência de co-morbidades em metabolizadores rápidos ou lentos do CYP2D6 em relação a não portadores de diabetes tipo 2.

10- A variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com o *handgrip* após a administração de dose única oral de 25 mg de carvedilol racêmico não mostra relação com as concentrações plasmáticas individuais preditas do (S)-(-)-carvedilol.

Referências bibliográficas:

AARONS, L. Sparse data-analysis. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 18, n. 1, p. 97-100, Jan-Mar 1993. ISSN 0378-7966.

ADITHAN, C. et al. Differential effect of type I and type II diabetes *mellitus* on antipyrine elimination. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 12, p. 755-758, Dec 1989. ISSN 0379-0355.

_____. Effect of diabetes *mellitus* on salivary paracetamol elimination. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. 6, p. 465-471, Jun 1988. ISSN 0305-1870.

ALBERS, S. et al. Population pharmacokinetics and dose simulation of carvedilol in paediatric patients with congestive heart failure. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 511-522, Apr 2008. ISSN 0306-5251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000253883800010 >.

ALBRECHT, C. et al. Leukocyte ABCA1 gene expression is associated with fasting glucose concentration in normoglycemic men. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 53, n. 1, p. 17-21, Jan 2004. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187619100004 >.

ALLCOCK, D. M.; SOWERS, J. R. Best Strategies for Hypertension Management in Type 2 Diabetes and Obesity. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 2, p. 139-144, Apr 2010. ISSN 1534-4827.

ANVISA. **Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**. SANITÁRIA, M. D. S. A. N. D. V. Brasília - BR 2012.

ATALAY, M. et al. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 161, n. 2, p. 195-201, Oct 1997. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997YB83700009 >.

AYERS, K. et al. Differential Effects of Nebivolol and Metoprolol on Insulin Sensitivity and Plasminogen Activator Inhibitor in the Metabolic Syndrome. **Hypertension**, v. 59, n. 4, p. 893-898, Apr 2012. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301716100033 >.

BAKRIS, G. L. et al. Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension - A randomized controlled trial. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 18, p. 2227-2236, Nov 2004. ISSN 0098-7484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225070000023 >.

BART, J. et al. New positron emission tomography tracer C-11 carvedilol reveals P-glycoprotein modulation kinetics. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 8, p. 1045-1051, Aug 2005. ISSN 0007-1188. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231722000005 >.

BAUER, R. J. **NONMEM users guide: introduction to NONMEM 7.2.0**. Ellicott City, Maryland, USA: ICON Development Solutions: 128 p. 2011.

BELL, D. S. H.; BAKRIS, G. L.; MCGILL, J. B. Comparison of carvedilol and metoprolol on serum lipid concentration in diabetic hypertensive patients. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 234-238, Mar 2009. ISSN 1462-8902.

BERGSTRAND, M. et al. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models. **Aaps Journal**, v. 13, n. 2, p. 143-151, Jun 2011. ISSN 1550-7416. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290165700001 >.

BESSADOK, A. et al. Recognition of Sulfonylurea Receptor (ABCC8/9) Ligands by the Multidrug Resistance Transporter P-glycoprotein (ABCB1) FUNCTIONAL SIMILARITIES BASED ON COMMON STRUCTURAL FEATURES BETWEEN TWO MULTISPECIFIC ABC PROTEINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 5, p. 3552-3569, Feb 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286653200040 >.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 453.

COMETS, E.; BRENDEL, K.; MENTRE, F. Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models: The npde add-on package for R. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 90, n. 2, p. 154-166, May 2008. ISSN 0169-2607. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255381700007 >.

DAHLOF, B. et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-

Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 366, n. 9489, p. 895-906, Sep 2005. ISSN 0140-6736. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000231770000027 >.

DEVINENI, D. et al. Effects of rifampin, cyclosporine A, and probenecid on the pharmacokinetic profile of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, in healthy participants. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 53, n. 2, p. 115-128, Feb 2015. ISSN 0946-1965. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000350009600002 >.

DINCER, Y. et al. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycemic control. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 297-301, Jun 2002. ISSN 0009-9120. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000177355800008 >.

DORNHORST, A.; POWELL, S. H.; PENSKY, J. AGGRAVATION BY PROPRANOLOL OF HYPERGLYCEMIC EFFECT OF HYDROCHLOROTHIAZIDE IN TYPE-II DIABETICS WITHOUT ALTERATION OF INSULIN-SECRETION. **Lancet**, v. 1, n. 8421, p. 123-126, 1985. ISSN 0140-6736. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1985AAF0100001 >.

DOSTALEK, M.; AKHLAGHI, F.; PUZANOVOVA, M. Effect of Diabetes Mellitus on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, n. 8, p. 481-499, 2012. ISSN 0312-5963. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000306634200001 >.

DOWD, P. A.; PARDO-IGUZQUIZA, E.; EGOZCUE, J. J. The total bootstrap median: a robust and efficient estimator of location and scale for small samples. **Journal of Applied Statistics**, v. 42, n. 6, p. 1306-1321, Jun 2015. ISSN 0266-4763. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000350365800010 >.

DUFFULL, S. B. et al. Analysis of population pharmacokinetic data using NONMEM and WinBUGS. **Journal of Biopharmaceutical Statistics**, v. 15, n. 1, p. 53-73, 2005. ISSN 1054-3406.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. PS power and sample size program available for free on the Internet. **Controlled Clinical Trials**, v. 18, n. 3, p. 274-274, Jun 1997. ISSN 0197-2456. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1997XF53400007 >.

EISENBERG, E. J.; PATTERSON, W. R.; KAHN, G. C. High-performance liquid-chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its ortho-desmethyl metabolite in human-plasma after chiral derivatization. **Journal of Chromatography-Biomedical Applications**, v. 493, n. 1, p. 105-115, Aug 1989. ISSN 0378-4347.

EPSTEIN, M.; SOWERS, J. R. Diabetes *mellitus* and hypertension. **Hypertension**, v. 19, n. 5, p. 403-418, May 1992. ISSN 0194-911X.

ETTE, E. I.; WILLIAMS, P. J. Population pharmacokinetics - I: Background, concepts, and models. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 10, p. 1702-1706, Oct 2004. ISSN 1060-0280. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224066200024 >.

ETTE, E. I.; WILLIAMS, P. J.; LANE, J. R. Population pharmacokinetics - III: Design, analysis, and application of population pharmacokinetic studies. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 12, p. 2136-2144, Dec 2004. ISSN 1060-0280. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225337300023 >.

FARIA, A. N. et al. Tratamento de Diabetes e Hipertensão no Paciente Obeso. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 2, p. 10, 2002.

Food and Drug Administration (FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). **Guidance for Industry Population Pharmacokinetics**. (FDA), U. S. D. O. H. A. H. S. F. A. D. A.;(CDER), C. F. D. E. A. R., *et al*. Rockville MD 1999.

FISHER, D.; SHAFER, S. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis with NONMEM**. Het Pand, Ghent, Belgium: 111 p. 2007.

FONSECA, V. et al. Differential effect of beta-blocker therapy on insulin resistance as a function of insulin sensitizer use: results from GEMINI. **Diabetic Medicine**, v. 24, n. 7, p. 759-763, Jul 2007. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247561000012 >.

FREITAS, L. R. S.; GARCIA, L. P. Evolução da prevalência do diabetes e deste associado à hipertensão arterial no Brasil: análise da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, 1998, 2003 e 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 13, 08/02/2012 2012. ISSN 1679-4974. Disponível em: <

http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742012000100002&lng=pt&nrm=iso >.

FUJIMAKI, M.; MURAKOSHI, Y.; HAKUSUI, H. ASSAY AND DISPOSITION OF CARVEDILOL ENANTIOMERS IN HUMANS AND MONKEYS - EVIDENCE OF STEREOSELECTIVE PRESYSTEMIC METABOLISM. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 7, p. 568-572, Jul 1990. ISSN 0022-3549.

FURLONG, M. T. et al. A validated enantioselective LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of carvedilol and its pharmacologically active 4'-hydroxyphenyl metabolite in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 574-579, Nov 2012. ISSN 0731-7085.

GEHR, T. W. B. et al. The pharmacokinetics of carvedilol and its metabolites after single and multiple dose oral administration in patients with hypertension and renal insufficiency. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 269-277, Jun 1999. ISSN 0031-6970.

GIESSMANN, T. et al. CYP2D6 genotype and induction of intestinal drug transporters by rifampin predict presystemic clearance of carvedilol in healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 75, n. 3, p. 213-222, Mar 2004. ISSN 0009-9236.

GIUGLIANO, D. et al. Metabolic and cardiovascular effects of carvedilol and atenolol in non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension - A randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 12, p. 955-959, Jun 1997. ISSN 0003-4819. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XE54900007 >.

GOLSTEIN, P. E. et al. P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 437, n. 5, p. 652-660, Apr 1999. ISSN 0031-6768. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079537200003 >.

GRESS, T. W. et al. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 13, p. 905-912, Mar 2000. ISSN 0028-4793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000086179700001 >.

HANIOKA, N. et al. Stereoselective Glucuronidation of Carvedilol in Human Liver and Intestinal Microsomes. **Pharmacology**, v. 90, n. 3-4, p. 117-124, 2012. ISSN 0031-7012. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309695900001 >.

HOLSTEIN, A.; BEIL, W.; KOVACS, P. CYP2C metabolism of oral antidiabetic drugs - impact on pharmacokinetics, drug interactions and pharmacogenetic aspects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 8, n. 12, p. 1549-1563, Dec 2012. ISSN 1742-5255. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000311235000005 >.

HOLZGREVE, H. et al. Anti hypertensive therapy with verapamil SR plus trandolapril versus atenolol plus chlorthalidone on glycemic control. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 381-386, May 2003. ISSN 0895-7061. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182808800009 >.

HONDA, M. et al. Effect of CYP2D6*10 on the pharmacokinetics of R- and S-carvedilol in healthy Japanese volunteers. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1476-1479, Aug 2005. ISSN 0918-6158.

HORIUCHI, I. et al. Pharmacokinetics of R- and S-Carvedilol in routinely treated Japanese patients with heart failure. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 976-980, May 2008. ISSN 0918-6158.

HOZO, S. P.; DJULBEGOVIC, B.; HOZO, I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. **BMC Medical Research Methodology**, v. 5, n. 13, 20 April 2005 2005. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2288/5/13> >.

ISHIDA, K. et al. Stereoselective oxidation and glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1297-1300, Jun 2008. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258634800046 >.

JABOR, V. A. P. et al. A highly sensitive LC-MS-MS assay for analysis of midazolam and its major metabolite in human plasma: Applications to drug metabolism. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1-2, p. 27-32, Aug 2005. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000231008900004 >.

JACOB, S. et al. Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: The carvedilol-metoprolol study. **Journal of Hypertension**, v. 14, n. 4, p. 489-494, Apr 1996. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UM84600012 >.

JIANG, J. J. et al. Enantioselective and sensitive determination of carvedilol in human plasma using chiral stationary-phase column and reverse-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 960, p. 92-97, Jun 2014. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336821600014 >.

JOERGER, M. Covariate Pharmacokinetic Model Building in Oncology and its Potential Clinical Relevance. **Aaps Journal**, v. 14, n. 1, p. 119-132, Mar 2012. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300554000014 >.

KAMIYA, A. et al. Static handgrip exercise modifies arterial baroreflex control of vascular sympathetic outflow in humans. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 4, p. R1134-R1139, Oct 2001. ISSN 0363-6119.

KASICHAYANULA, S. et al. Effects of rifampin and mefenamic acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of dapagliflozin. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 280-283, Mar 2013. ISSN 1462-8902. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314182500014 >.

KIM, H. G. et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF-kappa B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 5, p. 1096-1108, Mar 2011. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286668500008 >.

KIM, K. A.; PARK, J. Y. Inhibitory effect of glyburide on human cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 9, p. 1090-1092, Sep 2003. ISSN 0090-9556. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184764600006 >.

KIRCHHEINER, J. et al. Influence of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics and cholesterol-lowering activity of (-)-3S,5R-fluvastatin and (+)-3R,5S-fluvastatin in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 2, p. 186-194, Aug 2003. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184679100011 >.

KUBO, T. et al. Lack of evidence for peripheral alpha(1)-adrenoceptor blockade during long-term treatment of heart failure with carvedilol. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, n. 5, p. 1463-1469, Nov 2001. ISSN 0735-1097.

LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 10, p. 1271-1294, Nov 2002. ISSN 0169-409X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179375700005 >.

LI, J. W. et al. Simultaneous quantification of carvedilol and its metabolites in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 974, p. 138-146, Jan 2015. ISSN 1570-0232. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000346540800019 >.

LINDBOM, L.; PIHLGREN, P.; JONSSON, N. PsN-Toolkit - A collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 79, n. 3, p. 241-257, Sep 2005. ISSN 0169-2607. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000231971600005 >.

MAGIERA, S.; ADOLF, W.; BARANOWSKA, I. Simultaneous chiral separation and determination of carvedilol and 5'-hydroxyphenyl carvedilol enantiomers from human urine by high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2076-2087, Dec 2013. ISSN 1895-1066. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324816200017 >.

MAITRE, P. O. et al. A 3-STEP APPROACH COMBINING BAYESIAN REGRESSION AND NONMEM POPULATION ANALYSIS - APPLICATION TO MIDAZOLAM. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 19, n. 4, p. 377-384, Aug 1991. ISSN 0090-466X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991GH41100001 >.

MARQUES, M. P. et al. Dynamic and kinetic disposition of nisoldipine enantiomers in hypertensive patients presenting with type-2 diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 607-614, Dec 2002. ISSN 0031-6970. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180044400007 >.

MAULDIN, J. P. et al. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes

mellitus. **Circulation**, v. 117, n. 21, p. 2785-2792, May 2008. ISSN 0009-7322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256160700010 >.

MCROBIE, D. J.; GLOVER, D. D.; TRACY, T. S. Effects of gestational and overt diabetes on human placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 4, p. 367-371, Apr 1998. ISSN 0090-9556. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000072978500014 >.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A SIMPLE SALTING OUT PROCEDURE FOR EXTRACTING DNA FROM HUMAN NUCLEATED CELLS. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215-1215, Feb 1988. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988M020700047 >.

MURALI, K. V. et al. Antipyrine metabolism in patients with diabetes *mellitus*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 10, n. 1, p. 7-13, 1983. ISSN 0305-1870.

NARANG, A. P. S.; DUTTA, D. V.; KHARE, A. K. Impairment of drug clearance in patients with diabetes *mellitus* and liver cirrhosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 85, p. 321-325, Mar 1987. ISSN 0971-5916.

NAWA, A.; FUJITA, W.; TOKUYAMA, S. Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions. **Life Sciences**, v. 86, n. 11-12, p. 402-409, Mar 2010. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275489900004 >.

NAWA, A.; FUJITA-HAMABE, W.; TOKUYAMA, S. Regulatory Action of Nitric Oxide Synthase on Ileal P-glycoprotein Expression under Streptozotocin-Induced Diabetic Condition. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 436-438, Mar 2011. ISSN 0918-6158. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287821800024 >.

NEUGEBAUER, G. et al. Stereoselective disposition of carvedilol in man after intravenous and oral administration of the racemic compound. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 38, p. S108-S111, 1990. ISSN 0031-6970.

_____. Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 10, n. Suppl.11, p. S85-S88, 1987. Disponível em: <

http://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Abstract/1987/10004/Pharmacokinetics_and_Disposition_of_Carvedilol_in.15.aspx >.

NEUGEBAUER, G.; NEUBERT, P. Metabolism of carvedilol in man. **Metabolism of carvedilol in man**, v. 16, n. 4, p. 257-260, Oct-Dec 1991. ISSN 0378-7966.

OHNO, A. et al. Involvement of human hepatic UGT1A1, UGT2B4, and UGT2B7 in the glucuronidation of carvedilol. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 2, p. 235-239, Feb 2004. ISSN 0090-9556. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188426900011 >.

OLDHAM, H. G.; CLARKE, S. E. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 25, n. 8, p. 970-977, Aug 1997. ISSN 0090-9556. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XR11700010 >.

PANDEY, V.; CHAUBE, B.; BHAT, M. K. Hyperglycemia Regulates MDR-1, Drug Accumulation and ROS Levels Causing Increased Toxicity of Carboplatin and 5-Fluorouracil in MCF-7 Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 2942-2952, Oct 2011. ISSN 0730-2312. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295623300031 >.

PARKE, J.; HOLFORD, N. H. G.; CHARLES, B. G. A procedure for generating bootstrap samples for the validation of nonlinear mixed-effects population models. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 59, n. 1, p. 19-29, Apr 1999. ISSN 0169-2607. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079188000002 >.

PATEL, D. P. et al. UPLC-MS/MS assay for the simultaneous quantification of carvedilol and its active metabolite 4-hydroxyphenyl carvedilol in human plasma to support a bioequivalence study in healthy volunteers. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 8, p. 974-986, Aug 2013. ISSN 0269-3879.

PECCININI, R. G. et al. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma and urine using HPLC after chiral derivatization. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 29, n. 5, p. 280-288, Jul 2008. ISSN 0142-2782. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258081300004 >.

PHUONG, N. T. et al. Enantioselective pharmacokinetics of carvedilol in human volunteers. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 9, p. 973-977, Sep 2004. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224106700016 >.

PIANA, C. et al. Covariate effects and population pharmacokinetics of lamivudine in HIVinfected children. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 5, p. 861-872, May 2014. ISSN 0306-5251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000334782800014 >.

POGGI, J. C. et al. Analysis of carvedilol enantiomers in human plasma using chiral stationary phase column and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Chirality**, v. 24, n. 3, p. 209-214, Mar 2012. ISSN 0899-0042.

POOLE-WILSON, P. A. et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol, European Trial (COMET): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 362, n. 9377, p. 7-13, Jul 2003. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000184056900007 >.

RETLICH, S. et al. Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Linagliptin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Pharmacokinetics**, v. [Eletronic publication ahead of print], 2015.

RIBBING, J. **Covariate Model Building in Nonlinear Mixed Effects Models**. 2007. 78 (doctorate). Department of pharmaceutical Biosciences, Uppsala university, Uppsala, Sweden.

RIBBING, J.; JONSSON, E. N. Power, selection bias and predictive performance of the population pharmacokinetic covariate model. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 31, n. 2, p. 109-134, Apr 2004. ISSN 1567-567X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222566100001 >.

SAITO, M. et al. Population Pharmacokinetics of R- and S-Carvedilol in Japanese Patients with Chronic Heart Failure. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1378-1384, Aug 2010. ISSN 0918-6158.

_____. Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical**

Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 843, n. 1, p. 73-77, Oct 2006. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241472400011 >.

SALMELA, P. I.; SOTANIEMI, E. A.; PELKONEN, R. O. The evaluation of the drug-metabolizing capacity in patients with diabetes *mellitus*. **Diabetes**, v. 29, n. 10, p. 788-794, 1980. ISSN 0012-1797.

Sociedade Brasileira de Diabetes. **Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2**. DIABETES, S. B. D.: Sociedade Brasileira de Diabetes: 32 p. 2011.

SCHOEMAKER, R. C.; COHEN, A. F. Estimating impossible curves using NONMEM. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 283-290, Sep 1996. ISSN 0306-5251. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VF23500001 >.

SHEINER, L. B.; BEAL, S. L. EVALUATION OF METHODS FOR ESTIMATING POPULATION PHARMACOKINETIC PARAMETERS .1. MICHAELIS-MENTEN MODEL - ROUTINE CLINICAL PHARMACOKINETIC DATA. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 553-571, 1980. ISSN 0090-466X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980LM43500002 >.

_____. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 635-651, 1981. ISSN 0090-466X.

_____. EVALUATION OF METHODS FOR ESTIMATING POPULATION PHARMACOKINETIC PARAMETERS .3. MONOEXPONENTIAL MODEL - ROUTINE CLINICAL PHARMACOKINETIC DATA. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 303-319, 1983. ISSN 0090-466X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RM36400006 >.

SHEINER, L. B.; LUDDEN, T. M. Population Pharmacokinetics/Dynamics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, p. 185-209, 1992. ISSN 0362-1642.

SHEINER, L. B.; ROSENBERG, B.; MARATHE, V. V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 5, n. 5, p. 445-479, 1977. ISSN 0090-466X.

SILVA, F. G. D. **Influência do diabetes mellitus e da insuficiência renal crônica em tratamento dialítico na farmacocinética e farmacodinâmica do carvedilol em pacientes hipertensos**. 2008. 145 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOHN, D. R. et al. UTILITY OF A ONE-POINT (3-HOUR POSTDOSE) PLASMA METABOLIC RATIO AS A PHENOTYPING TEST USING METOPROLOL IN 2 EAST-ASIAN POPULATIONS. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 14, n. 3, p. 184-189, Jun 1992. ISSN 0163-4356.

SOWERS, J. R.; EPSTEIN, M.; FROHLICH, E. D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease - An update. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1053-1059, Apr 2001. ISSN 0194-911X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000168379400003 >.

STOSCHITZKY, K. et al. Stereoselective effects of (R)- and (S)-carvedilol in humans. **Chirality**, v. 13, n. 7, p. 342-346, Jul 2001. ISSN 0899-0042.

SURENDIRAN, A. et al. Influence of CYP2C9 gene polymorphisms on response to glibenclamide in type 2 diabetes mellitus patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 67, n. 8, p. 797-801, Aug 2011. ISSN 0031-6970. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293789800005 >.

TAKARA, K.; SAKAEDA, T.; OKUMURA, K. Carvedilol: a new candidate for reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. **Anti-Cancer Drugs**, v. 15, n. 4, p. 303-309, Apr 2004. ISSN 0959-4973. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221001500001 >.

TAKEKUMA, Y. et al. Stereoselective metabolism of racemic carvedilol by UGT1A1 and UGT2B7, and effects of mutation of these enzymes on glucuronidation activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 11, p. 2146-2153, Nov 2007. ISSN 0918-6158. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251595900025 >.

TENERO, D. et al. Steady-state pharmacokinetics of carvedilol and its enantiomers in patients with congestive heart failure. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 8, p. 844-853, Aug 2000. ISSN 0091-2700. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088308500005 >.

TENERO, D. M. et al. Pharmacokinetic properties of a new controlled-release formulation of carvedilol. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 7A, p. 5L-16L, Oct 2006. ISSN 0002-9149. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000241321000002 >.

TIRKKONEN, T. et al. Potential CYP2C9-mediated drug-drug interactions in hospitalized type 2 diabetes mellitus patients treated with the sulphonylureas glibenclamide, glimepiride or glipizide. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 4, p. 359-366, Oct 2010. ISSN 0954-6820.

TORP-PEDERSEN, C. et al. Effects of metoprolol and carvedilol on pre-existing and new onset diabetes in patients with chronic heart failure: data from the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET). **Heart**, v. 93, n. 8, p. 968-973, Aug 2007. ISSN 1355-6037. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248054400023 >.

TRACY, T. S. et al. Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A activity) during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 2, p. 633-639, Feb 2005. ISSN 0002-9378. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226989000050 >.

UEDA, H. et al. Disappearance rate of Tolbutamide in normal subjects and in diabetes mellitus liver cirrhosis and renal disease. **Diabetes**, v. 12, n. 5, p. 414-&, 1963. ISSN 0012-1797.

VANMOLLENDORFF, E.; REIFF, K.; NEUGEBAUER, G. Pharmacokinetics and bioavailability of carvedilol, a vasodilating beta-blocker. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 511-513, 1987. ISSN 0031-6970.

WAHLBY, U.; JONSSON, E. N.; KARLSSON, M. O. Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 3, p. 231-252, Jun 2001. ISSN 1567-567X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169826200002 >.

_____. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. **Aaps Pharmsci**, v. 4, n. 4, p. 12, 2002. ISSN 1522-1059.

WANG, Z. C. et al. Human UGT1A4 and UGT1A3 Conjugate 25-Hydroxyvitamin D-3: Metabolite Structure, Kinetics, Inducibility, and Interindividual Variability.

Endocrinology, v. 155, n. 6, p. 2052-2063, Jun 2014. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342342900002 >.

WILLIAMSON, B. et al. Induction of Influx and Efflux Transporters and Cytochrome P450 3A4 in Primary Human Hepatocytes by Rifampin, Rifabutin, and Rifapentine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 12, p. 6366-6369, Dec 2013. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000328959900073 >.

YAFUNE, A.; ISHIGURO, M. Bootstrap approach for constructing confidence intervals for population pharmacokinetic parameters. II: A bootstrap modification of standard two-stage (STS) method for phase I trial. **Statistics in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 601-612, Mar 1999. ISSN 0277-6715. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079152900007 >.

YANG, E. et al. Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLUMS/MS after chiral derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 3, p. 609-615, Nov 2004. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225354200024 >.

YANO, Y.; BEAL, S. L.; SHEINER, L. B. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 28, n. 2, p. 171-192, Apr 2001. ISSN 1567-567X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168838100004 >.

YEH, S. Y. et al. Hyperglycemia induced down-regulation of renal P-glycoprotein expression. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1-3, p. 42-50, Sep 2012. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306965200006 >.

YOON, Y. R. et al. Relationship of paroxetine disposition to metoprolol metabolic ratio and C_{ps} P2D6*10 genotype of Korean subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 67, n. 5, p. 567-576, May 2000. ISSN 0009-9236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087116800015 >.

ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK, M. et al. Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 636-641, Aug 2010. ISSN 0731-7085. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000276057300029 >.

ZHAO, W. et al. Population pharmacokinetics of abacavir in infants, toddlers and children. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1525-1535, Jun 2013. ISSN 0306-5251. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000319276400014 >.

ZHOU, H. H.; WOOD, A. J. J. Stereoselective disposition of carvedilol is determined by CYP2D6. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, n. 5, p. 518-524, May 1995. ISSN 0009-9236.

ZYSSET, T.; WIETHOLTZ, H. Differential effect of type II and type II diabetes on Antipyrine disposition in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 4, p. 369-375, 1988. ISSN 0031-6970.

Anexo

Gráficos de avaliação da qualidade do ajuste do modelo aos dados. Gráficos de métodos visuais de validação do modelo hierárquico de efeitos mistos com covariáveis.

Os gráficos de qualidade do ajuste do modelo aos dados (*goodnes of fit - gof*) estão apresentados na figura 25, podendo-se observar que os resíduos condicionais ponderados (CWRES) estão aleatoriamente distribuídos em torno do zero para os 6 enantiômeros ao longo do tempo e das concentrações populacionais preditas (figuras 23 C e 23 D). As concentrações observadas vs concentrações preditas populacionais e individuais (figuras 23 A e 23 B) também estão aleatoriamente distribuídas ao longo da linha de identificação com intercepto zero e inclinação 1, mostrando que de forma geral as previsões populacionais e individuais descrevem os dados adequadamente.

Figura 25: Graficos de qualidade do ajuste do modelo (goodnes of fit – gof).

Concentrações observadas vs concentrações preditas populacionais (A) e individuais (B). Resíduos condicionais ponderados vs concentrações preditas populacionais (C) e Tempo (D).

Os gráficos espelhos (*mirror plots*) dos 6 enantiômeros são representados na figura 26, 27, 28 e mostram que a estrutura da matriz de variância-covariância caracteriza adequadamente os dados, pois os conjuntos de dados simulados (1 a 5) produziram um padrão de dispersão semelhante ao dos dados observados (clínicos), mostrando similaridade mostrando a similaridade de ambo e o ajuste do modelo aos dados.

Figura 26: Gráficos espelhos (*mirror plots*) dos enantiômeros do carvedilol. Concentrações preditas individuais e populacionais vs concentrações observadas e resíduos condicionais ponderados (CWRES) vs concentrações populacionais preditas.

Figura 27: Gráficos espelhos (*mirror plots*) dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol. Concentrações preditas individuais e populacionais vs concentrações observadas e resíduos condicionais ponderados (CWRES) vs concentrações populacionais preditas.

Figura 28: Gráficos espelhos (*mirror plots*) dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol. Concentrações preditas individuais e populacionais vs concentrações observadas e resíduos condicionais ponderados (CWRES) vs concentrações populacionais preditas.

A avaliação visual preditiva (*VPC – visual predictive check*) do modelo (figuras 29 e 30) é uma indicação da adequada predição dos dados observados pelo modelo. Os percentis das concentrações observadas ao longo do tempo coincidem com os mesmos percentis das concentrações simuladas de cada indivíduo 1000 vezes, indicando a adequação do modelo aos dados observados e bom desempenho preditivo.

Figura 29: Verificação visual preditiva (VPC – *visual predictive check*) dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos. Linha tracejada: percentis 5, 50 e 95% das concentrações plasmáticas observadas ao longo do tempo. Linha contínua: o mesmo para mediana. Área hachurada: percentil estratificado 5, 50 e 95% das concentrações plasmáticas simuladas (1000).

Figura 30: Verificação visual preditiva (VPC – *visual predictive check*) dos enantiômeros do carvedilol e seus metabólitos. Linha tracejada: percentis 5, 50 e 95% e das concentrações plasmáticas observadas ao longo do tempo. Linha contínua: o mesmo para mediana. Área hachurada: percentis estratificados 5, 50 e 95% das concentrações plasmáticas simuladas (1000).

A avaliação pós preditiva (PPC) (figuras 31-33) gera uma indicação da capacidade preditiva populacional do modelo. Os histogramas são a distribuição dos valores de AUC^{0-24} obtidos por 1000 simulações de cada indivíduo que estão apresentadas juntamente com as medianas da AUC^{0-24} obtidas pelos dados observados (linha vermelha). Nota-se que a AUC^{0-24} observada é próxima do centro da distribuição dos histogramas e que a distribuição dos histogramas é aproximadamente normal para os 6 enantiômeros.

Figura 31: PPC dos enantiômeros do carvedilol. Histogramas de frequências das AUC^{0-24} simuladas. Linha: Mediana das AUC^{0-24} observadas.

Figura 32: PPC dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol. Histogramas de frequências das AUC⁰⁻²⁴ simuladas. Linha: Mediana das AUC⁰⁻²⁴ observadas.

Figura 33: PPC dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol. Histogramas de frequências das AUC⁰⁻²⁴ simuladas. Linha: Mediana das AUC⁰⁻²⁴ observadas.

As figuras 34-36 mostram os histogramas de distribuição do NPDE (*normalised prediction distribution errors*) e indicam se a hipótese de uma distribuição normal das diferenças entre as previsões dos dados individuais e dos dados observados é aceitável. Pode-se observar que os erros estão distribuídos de forma aproximadamente normal (histogramas de frequência e gráficos [quartil-quartil (Q-Q plot)] e que a predição pelo

modelo foi precisa (linha vermelha). Também não são observadas grandes distorções nos gráficos NPDE vs concentrações preditas pelo teste ou NPDE vs tempo.

Figura 34: Análise de NPDE dos enantiômeros do carvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclâmida e metformina. Histograma de densidade (A). NPDE vs concentrações preditas (B) e tempo (C). Abaixo: gráfico quantil-quantil (Q-Q NPDE-normal).

Figura 35: Análise de NPDE dos enantiômeros do hidroxifenilcarvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

Histograma de densidade (A). NPDE vs concentrações preditas (B) e tempo (C). Abaixo: gráfico quantil-quantil (Q-Q NPDE-normal).

Figura 36: Análise de NPDE dos enantiômeros do O-desmetilcarvedilol em indivíduos metabolizadores rápidos do CYP2D6 sadios e portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina.

Histograma de densidade (A). NPDE vs concentrações preditas (B) e tempo (C). Abaixo: gráfico quantil-quantil (Q-Q NPDE-normal).

Apêndice 1

Termo de consentimento livre e esclarecido da PARTE 1 do estudo destinado aos voluntários sadios

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO VOLUNTÁRIO / IDADE:/.....

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME DA PESQUISA: Influência da inibição da P-gp pela Glibenclamida na farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do Carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho (FMRP-USP)

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em / / concordei voluntariamente em participar, como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado(a) em detalhes pelo médico responsável que:

- 1- O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

“O Carvedilol é um remédio importante utilizado no tratamento da hipertensão e a Glibenclamida é outro remédio importante no tratamento do diabetes tipo 2. Essa pesquisa busca verificar se a Glibenclamida altera a quantidade de Carvedilol no sangue e se ela também altera o efeito do Carvedilol. Para o Sr(a). participar dessa pesquisa precisará estar em jejum de 12 horas, será internado(a) na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e irá ingerir um comprimido de 25 mg de Carvedilol. Nesse período iremos instalar aparelhos para registrar as batidas do seu coração e também iremos colher o sangue de uma veia do seu braço por cerca de 15 vezes, retirando uma colher de sopa de sangue por vez (5mL). Você será picado apenas uma vez para a colocação de um tubinho de plástico dentro da sua veia. Na segunda parte da pesquisa, em outro dia, o(a) Sr(a). novamente precisará estar em jejum de 12 horas, será internado na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e desta vez irá ingerir um comprimido de 25 mg de Carvedilol e um de 5 mg de Glibenclamida. Necessitamos novamente registrar as batidas do seu coração e obter sangue da mesma forma como descrito anteriormente. Na seqüência você irá tomar uma única dose de 2 remédios (1 comprimido de metoprolol 10 mg e 1 comprimido

Termo de consentimento livre e esclarecido da PARTE 1 do estudo destinado aos voluntários sadios

de midazolam 15 mg). Nesse período novamente iremos colher amostras de sangue até 6 h após a administração dos remédios e iremos realizar exames para verificar se o fígado está eliminando os remédios de forma adequada.

“A sua participação nesse estudo fornecerá valiosa informação sobre o comportamento de remédios que ajudará a evoluir o tratamento das doenças”

- 2- Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a qualquer penalização ou discriminação.
- 3- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como voluntária.
- 4- A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
- 5- A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento ao qual serei submetida.
- 6- O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:.....

Ribeirão Preto, dede 201.....

 Assinatura do voluntário

 Aluno: Glauco Henrique Balthazar Nardotto

RG ou CPF:

CPF: 218632948-48

 Profa. Dra. Vera Lanchote

 Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

CPF: 033163688-33

CPF: 058132438-28

Termo de consentimento livre e esclarecido da PARTE 2 do estudo destinado aos pacientes portadores de diabetes tipo II

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PESQUISA CIENTÍFICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO VOLUNTÁRIO / IDADE:/.....

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME DA PESQUISA: Influência da inibição da P-gp pela Glibenclamida na farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do Carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

RESPONSÁVEL CLÍNICO: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho (FMRP-USP)

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que em / / concordei voluntariamente em participar, como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado(a) em detalhes pelo médico responsável que:

- 1- O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, conforme texto a seguir:

“O Carvedilol é um remédio importante utilizado no tratamento da hipertensão e a Glibenclamida é outro remédio importante no tratamento do diabetes tipo 2. Essa pesquisa busca verificar se a Glibenclamida altera a quantidade de Carvedilol no sangue e se ela também altera o efeito do Carvedilol. Para o Sr(a). participar dessa pesquisa precisará estar em jejum de 12 horas, será internado(a) na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e irá ingerir um comprimido de 25 mg de Carvedilol. Nesse período iremos instalar aparelhos para registrar as batidas do seu coração e também iremos colher o sangue de uma veia do seu braço por cerca de 15 vezes, retirando uma colher de sopa de sangue por vez (5mL). Você será picado apenas uma vez para a colocação de um tubinho de plástico dentro da sua veia. Na sequência você irá tomar uma única dose de 2 remédios (1 comprimido de metoprolol 10 mg e 1 comprimido de midazolam 15 mg). Nesse período novamente iremos colher amostras de sangue até 6 h após a administração dos remédios e iremos realizar exames para verificar se o fígado está eliminando os remédios de forma adequada.

“A sua participação nesse estudo fornecerá valiosa informação sobre o comportamento de remédios que ajudará a evoluir o tratamento das doenças”

Termo de consentimento livre e esclarecido da PARTE 2 do estudo destinado aos pacientes portadores de diabetes tipo II

- 2- Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a qualquer penalização ou discriminação.
- 3- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como voluntária.
- 4- A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
- 5- A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento ao qual serei submetida.
- 6- O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando.

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:.....

Ribeirão Preto, dede 201.....

 Assinatura do voluntário

 Aluno: Glauco Henrique Balthazar Nardotto

RG ou CPF:

CPF: 218632948-48

 Profa. Dra. Vera Lanchote

 Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

CPF: 033163688-33

CPF: 058132438-28

Recibo do projeto no CEP

MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP			
PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0019.0.212.212-11	
Projeto de Pesquisa Influência da inibição da P-gp pela glibenclamida na farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários saudáveis e em pacientes portadores de diabetes melitos tipo 2			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
Pesquisador Responsável			
CPF 21863294848	Pesquisador Responsável Glaucio Henrique Balthazar Nardotto	Assinatura	
Comitê de Ética			
Data de Entrega 28/04/2011	Recebimento: Assinatura		

Folha de Rosto do Presente Projeto

X **MINISTÉRIO DA SAÚDE**
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 422054	
Projeto de Pesquisa Influência da inibição da P-gp pela glibenclamida na farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes melitos tipo 2					
Área de Conhecimento 2.00 - Ciências Biológicas - 2.10 - Farmacologia				Grupo Grupo III	Nível
Área(s) Temática(s) Especial(s)				Fase Não se Aplica	
Unitermos Carvedilol, Glibenclamida, Glicoproteína P, PK-PD, Diabetes tipo 2, Enantiosseletividade, Análise enantiomérica					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 26	Total Brasil 26	Nº de Sujeitos Total 26	Grupos Especiais		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out SIM	Sem Tratamento Específico SIM	Banco de Materiais Biológicos NÃO	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Glaucio Henrique Balthazar Nardotto			CPF 218.632.948-48	Identidade 32593864-7	
Área de Especialização FARMACOLOGIA CLÍNICA			Maior Titulação MESTRE	Nacionalidade BRASILEIRO	
Endereço AV. DO CAFÉ, S/Nº. CAMPUS UNIVERSITÁRIO USP			Bairro MONTE ALEGRE	Cidade RIBEIRÃO PRETO - SP	
Código Postal 14040-903	Telefone 1636024195 / 1691393055		Fax	Email nardotto@fcrp.usp.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: 28/04/2011			Assinatura
Instituição Proponente					
Nome Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP			CNPJ 63.025.530/0080-08	Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas			Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO	
Endereço Via do Café, s/n			Bairro Monte Alegre	Cidade Ribeirão Preto - SP	
Código Postal 14040-903	Telefone (16) 602-4181		Fax (16) 633-2960	Email fcrp@edu.usp.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: _____			Assinatura Prof. Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley Vice-Diretora no exercício da FCFRP-USP		
Data: ____/____/____					
Instituição Co-Participante					
Nome HCFMRPUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo			CNPJ 56.023.443/0001-52	Nacional/Internacional Nacional	
Unidade/Órgão Unidade de Pesquisa Clínica			Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO	
Endereço Campus Universitário de Monte Alegre			Bairro Monte Alegre	Cidade Ribeirão Preto - SP	
Código Postal 14048900	Telefone (16) 602-1000		Fax (16) 633-1144	Email cep@hcr.fmrp.usp.br	

Folha de Rosto do Presente Projeto

Folha de Rosto

Página 2 de 04

Prof.ª Dr.ª Marisa M. M. Pinhata
Vice-Coordenadora da Unidade
de Pesquisa Clínica HCFMRP-USP

Termo de Compromisso

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares

Nome:

Data: 25/07/2011

Assinatura

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 26/04/2011. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

IMPRIMIR

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP nº. 60/2011
kms

Ribeirão Preto, 5 de julho de 2011.

À Senhora

PROF.^a DR.^a VERA LÚCIA LANCHOTE

Pós-graduando Glauco Henrique Balthazar Nardotto

DACTB / FCFRP / USP

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 92ª Sessão Ordinária, realizada em 30/06/2011, o projeto de pesquisa intitulado "INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DA P-GP PELA GLIBENCLAMIDA NA FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DOS ENANTIÔMEROS DO CARVEDILOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS EM PACIENTES PORTADORES DO DIABETES MELITOS TIPO 2", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 219**.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, "*o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador*".

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

PROF.^a DR.^a MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 15 de julho de 2011

Projeto de pesquisa: "INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DA P-gp PELA GLIBENCLAMIDA NA FARMACOCINÉTICA-FARMACODINÂMICA DOS ENANTIÔMEROS DO CARVEDILOL EM VOLUNTÁRIOS SADIOS E EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITOS TIPO 2".

Pesquisadoras responsáveis: Profª Drª Vera Lúcia Lanchote (Orientadora)/ Glauco Henrique Balthazar Nardotto (Doutorando).

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

"O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar".

Ciente e de acordo:

Drª Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho
Coordenador da Unidade de Pesquisa
Clínica – UPC - HCFMRP-USP

Prof.ª Dr.ª Marisa M. M. Pinhal
Vice-Coordenadora da Unidade
de Pesquisa Clínica HCFMRP-USP

1/1

Ribeirão Preto, Preto, 25 de abril de 2011

DIREÇÃO ACADÊMICA DE ENSINO E PESQUISA LIBERAÇÃO DE PESQUISA Nº 012/2011

Comunicamos que o pesquisador **GLAUCO HENRIQUE BALTHAZAR NARDOTTO** Doutorando do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, cumpriu as exigências operacionais e legais, podendo dar início à coleta de dados no Centro de Saúde Escola-Sumarezinho da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para o trabalho **"INFLUÊNCIAS DA INIBIÇÃO DA P-gp PELA GLIBENCIMIDA NA FARMACOCINÉTICA FARMACODINÂMICA DOS ENANTIÔMEROS DO CARVEDILOL EM VOLUNTÁRIOS SÁDIOS E EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITOS TIPO 2". Projeto este orientado por V.Sa. e coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho.**

Atenciosamente,

Profª. Dra. Maria Célia Mendes
Diretora Acadêmica de Ensino e Pesquisa do
CSE-FMRP-USP

Ilma Sra.

Profª. Dra. Vera Lúcia Lanchote
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto

Estado de São Paulo
Secretaria da Saúde
www.saude.ribeiraopreto.sp.gov.br

OF. 699/12 – GS
RAS/ras

Ribeirão Preto, 22 de fevereiro de 2012.

Prezada Senhora,

Em atenção à solicitação de autorização de Projeto de Pesquisa intitulado “Influência da inibição da P-gp pela glibenclamida na farmacocinética-farmacodinâmica dos enantiômeros do carvedilol em voluntários sadios e em pacientes portadores de diabetes melitus tipo 2”, informamos que somos favoráveis à realização do referido Projeto.

Solicitamos que após a conclusão dos trabalhos, os resultados sejam repassados à Coordenadoria do Programa de Hipertensão Arterial desta Secretaria.

Cordialmente,

STÊNIO CORREIA MIRANDA
Secretário Municipal da Saúde

ILUSTRÍSSIMA SENHORA
VERA LÚCIA LANCHOTE
ORIENTADORA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS, TOXICOLÓGICAS E
BROMATOLÓGICAS
NESTA

Apêndice 2

Tabela I: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e avaliação metabólica dos voluntários e pacientes

ID	Genero	CRCL (μ mol/L)	MICL (mg/L)	MICM (μ g/min)	BRT (mg/dL)	BRD (mg/dL)	BRI (mg/dL)	HG (%)
1	homem	102,2	15,6	7,6	0,53	0,16	0,37	5,5
2	homem	106,1	10,8	13,2	0,65	0,15	0,5	5,2
3	mulher	87,9	3,4	3,2	0,56	0,11	0,46	5,4
4	mulher	97,9	4,4	2	0,41	0,13	0,28	5,4
5	homem	106,9	8,5	8,1	0,86	0,16	0,7	5,1
6	homem	100,5	5	6,8	0,66	0,12	0,54	5,8
7	mulher	99,6	4,3	5,2	0,26	0,09	0,17	5,1
8	homem	97,4	4,5	5,6	1,2	0,27	0,93	6,1
9	homem	105	10,6	6,6	0,43	0,13	0,3	5,4
10	homem	104	10,6	6,6	0,43	0,13	0,3	5,4
11	homem	103,9	16,1	8,1	0,51	0,11	0,39	5,3
12	homem	103,9	16,1	8,1	0,51	0,11	0,34	5,3
13	mulher	93,9	16,1	8,1	0,51	0,11	0,39	5,3
14	homem	108,3	8	6,2	0,51	0,21	0,3	7,3
15	mulher	85,2	17,7	1,7	0,68	0,22	0,46	6,3
16	homem	105,2	15,6	1,7	0,68	0,22	0,46	6,8
17	homem	103,6	.	.	0,54	0,17	0,37	6,8
18	mulher	90,3	10	9	0,41	0,15	0,26	5,8
19	homem	90,1	15,1	4,4	0,74	0,26	0,49	6,7
20	homem	100,1	15,1	4,4	0,74	0,26	0,49	6,7
21	homem	100,8		0,7	0,38	0,15	0,23	6,4
22	homem	81	.	.	0,4	0,11	0,29	6,5
23	mulher	81	.	.	0,4	0,11	0,29	6,5
24	mulher	90,4	5	6,7	0,41	0,1	0,31	6,7
25	homem	92,2	10,5	6,3	0,46	0,12	0,34	6,1
26	homem	90,8	17,4	0,7	0,38	0,15	0,23	7,4
27	homem	10,8	10,4	10	0,7	0,15	0,5	6,9

CRCL: *Clearance* da creatinina calculado por Cockcroft-Gault (homens: 53 a 106 μ mol/L. mulheres: 44 a 97 μ mol/L). MICL: Microalbuminúria por litro: (até 20 mg/L). MICM: Microalbuminúria por minuto: (até 13,5 μ g/min). BRT: Bilirrubina Total (0,2 a 1,2 mg/dL). BRD: Bilirrubina Direta (até 0,3 mg/dL). BRI: Bilirrubina Indireta (Até 0,9 mg/dL). HG: Hemoglobina glicada (4,3 a 7 %). ID: 1 a 13: Voluntários sadios e 14 a 27: Pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2.

Tabela II: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e atividade metabólica dos voluntários e pacientes investigados

ID	Genero	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	GGT (U/L)	GLI (mg/dL)	TGP (U/L)	TGO (U/L)	UR (mg/dL)
1	homem	135,4	4,1	73	93	42	23	31
2	homem	141	4,1	24	104	22,1	23,2	25
3	mulher	143,9	4,2	26	66	24,8	19,4	43
4	mulher	141,4	4	24	89	19	18	18
5	homem	138,4	4,5	41	99	33	19	28
6	homem	140,5	4,1	25	96	31	17	43
7	mulher	138,3	4,6	19	90	9	18	23
8	homem	139,9	4,2	22	47	12,3	19,2	35
9	homem	140	4,4	44	94	30,2	31,4	29
10	homem	140	4,4	44	94	30,2	31,4	29
11	homem	139	4,5	23	89	41	30	31
12	homem	139	4,5	23	89	31	30	31
13	mulher	139	4,5	23	89	41	30	31
14	homem	136,8	4	63	123	45	37	29
15	mulher	139	3,9	22	119	20	16	36
16	homem	139	3,9	22	125	20	16	36
17	homem	139	3,8	.	118	.	.	24
18	mulher	136,6	4,5	17	118	19	14	24
19	homem	136,1	3,9	42	128	26	18	21
20	homem	136,1	3,9	42	118	26	18	21
21	homem	143,9	4,8	13	96	18	17	22
22	homem	136,2	5,4	22	122	30	24	34
23	mulher	136,2	5,4	22	122	30	24	34
24	mulher	147,8	4,6	42	97	12,4	14,8	27
25	homem	136,8	4,6	38	125	28,9	30,2	19
26	homem	143,9	4,8	13	96	18	17	22
27	homem	133,9	4,7	30	120	28	27	22

Na: Sódio (135,0 a 145,0 mmol/L). K: Potássio (3,5 a 5,0 mmol/L). GGT: Gama GT (11 a 50 U/L). GLI: Glicemia de jejum (70 a 100 mg/dL). TGP: ALT / TGP (até 41 U/L). TGO: AST / TGO (Até 38,0 U/L). UR: Uréia (10,0 a 50,0 mg/dL). ID: 1 a 13: Voluntários sadios e 14 a 27: Pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2

Tabela III: Valores individuais de exames laboratoriais para avaliação das funções hepática e renal e atividade metabólica dos voluntários e pacientes investigados

ID	Genero	COL (mg/dL)	TRI (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	FA U/L	AC (mg/dL)
1	homem	166	140	40	98	.	5
2	homem	217	82	39	162	106	5,1
3	mulher	201	150	39	132	.	.
4	mulher	171	36	54	110	.	.
5	homem	183	143	32	102	115	.
6	homem	217	100	35	162	.	.
7	mulher	188	145	46	113	137	4,1
8	homem	124	58	37	75	.	.
9	homem	211	126	50	136	127	5,2
10	homem	211	126	50	136	127	5,2
11	homem	170	130	47	97	97	4,2
12	homem	170	130	47	97	97	4,2
13	mulher	170	130	47	97	97	4,2
14	homem	145	142	.	.	.	.
15	mulher	226	156	22	.	.	.
16	homem	206	156	22	.	.	.
17	homem	.	.	.	.	.	.
18	mulher	107	67	44	50	.	.
19	homem	181	132	42	113	.	.
20	homem	181	132	42	113	.	.
21	homem	126	149	31	65	.	4,6
22	homem	177	110	28	107	.	.
23	mulher	177	110	28	107	.	.
24	mulher	220	147	39	152	.	.
25	homem	183	163	66	84	125	.
26	homem	126	149	31	65	.	4,6
27	homem	130	140	40	90	.	.

COL: Colesterol (<200 mg/dL). TRI: Triglicérides (<150 mg/dL). HDL (>35 mg/dL). LDL (<130 mg/dL). FA: Fosfatase alcalina: 60 a 279 U/L. AC: ácido úrico: mulheres: 2,4 a 5,7 mg/dL, homens: 3,4 a 7,0 mg/dL. ID: 1 a 13: Voluntários sadios e 14 a 27: Pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2

Tabela IV: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-carvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	CL/F (L/h)	V2/F (L)	TMAX (h)	C _{MAX} (ng/mL)	V1/F (L)
1	1	52,03	5,20	238,83	798,64	1,06	17,24	291,09
2	1	129,14	5,23	96,80	259,27	0,90	38,60	122,86
3	1	43,34	4,69	288,45	1009,80	1,04	8,51	661,95
4	1	161,35	1,88	77,47	134,81	0,34	146,58	46,06
5	1	72,77	3,08	171,78	153,67	0,68	24,61	374,91
6	1	68,70	4,34	181,95	328,07	1,35	14,84	373,58
7	1	121,24	6,03	103,10	259,30	1,04	39,94	117,39
8	1	78,87	2,49	158,49	200,42	0,69	21,70	288,94
9	1	55,64	1,33	224,66	109,50	0,36	21,41	554,39
11	1	40,85	3,61	306,00	621,29	0,64	18,60	260,09
12	1	77,98	24,77	160,30	500,83	1,25	16,60	528,02
13	1	58,08	12,57	215,22	1346,55	1,01	16,69	530,29
1	2	69,80	3,34	179,08	207,70	0,63	17,57	626,24
2	2	71,90	7,00	173,85	712,54	0,74	14,56	752,79
3	2	57,25	7,31	218,35	309,59	1,04	12,59	781,38
4	2	142,12	4,17	87,95	179,58	0,42	55,49	205,53
5	2	106,25	5,71	117,65	554,45	0,66	46,09	202,86
6	2	64,18	9,40	194,76	357,23	0,91	17,86	538,12
7	2	82,04	4,56	152,36	400,33	1,18	17,19	346,43
8	2	124,13	2,51	100,70	232,98	0,48	62,34	77,80
9	2	52,60	2,55	237,63	365,03	0,70	21,71	227,48
11	2	39,93	3,39	313,08	619,92	0,66	19,05	255,45
12	2	90,68	3,05	137,85	296,51	0,71	27,76	213,52
13	2	73,56	4,72	169,94	456,24	1,27	13,51	467,47
14	3	132,69	6,75	94,21	417,03	0,94	29,08	311,16
15	3	99,09	12,37	126,15	455,98	1,33	40,72	242,48
16	3	90,20	3,29	138,58	311,38	0,89	29,53	178,15
17	3	39,77	4,93	314,29	1318,28	0,84	9,98	584,05
19	3	65,95	2,12	189,54	195,26	0,64	96,93	71,75
20	3	25,62	6,80	487,96	2867,41	1,42	6,48	773,66
21	3	44,34	3,19	281,94	559,55	0,98	17,84	283,74
22	3	71,50	6,87	174,83	413,60	1,60	12,48	606,26
23	3	213,77	4,34	58,47	183,23	0,53	68,45	110,99
24	3	186,11	4,44	67,17	168,22	0,50	97,34	89,14
25	3	110,33	6,63	113,30	478,88	2,62	24,12	376,16
26	3	176,64	3,03	70,76	131,11	0,36	125,30	82,44
27	3	90,30	3,0	140	407,17	3,9	0,5	233,93
18	4	107,17	4,01	49,82	1200,5	4,15	22,21	207,30

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. CL/F: *Clearance* aparente. V2/F: Volume de distribuição periférico aparente V1/F: Volume de distribuição central aparente. C_{max}: concentração plasmática máxima.

Tabela V: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-O-desmetilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	TMAX (h)	CMAX (ng/mL)
1	1	10,73	8,95	0,95	2,69
2	1	12,12	3,73	0,38	6,66
3	1	8,33	3,91	1,49	1,76
4	1	16,39	11,10	0,41	5,73
5	1	8,13	5,07	0,74	3,85
6	1	13,62	10,65	1,27	3,58
7	1	17,24	3,19	0,88	10,57
8	1	17,92	6,77	0,66	4,93
9	1	9,19	2,01	0,71	4,84
11	1	8,81	2,67	0,44	4,97
12	1	15,45	5,52	1,07	3,45
13	1	10,73	8,95	0,95	2,69
1	2	8,48	12,31	1,08	1,79
3	2	13,38	3,40	1,89	3,16
4	2	14,08	5,12	0,82	5,30
5	2	7,14	3,27	0,84	3,85
6	2	13,96	3,56	0,83	5,01
7	2	19,21	7,89	1,23	4,10
9	2	10,48	4,88	0,52	6,89
11	2	9,86	4,86	0,45	4,81
12	2	10,91	3,19	0,85	3,39
13	2	8,19	4,37	1,09	1,91
2	2	6,75	4,04	1,08	0,88
8	2	8,43	5,34	0,38	2,06
14	3	9,21	5,75	1,14	3,19
15	3	5,61	4,49	1,62	1,71
16	3	7,22	3,52	0,96	2,52
17	3	3,19	5,87	0,71	0,89
19	3	8,23	7,38	0,74	1,31
20	3	3,59	5,85	1,42	1,14
21	3	7,11	3,80	1,07	3,24
22	3	12,79	5,83	1,76	2,10
23	3	6,35	4,77	0,90	1,47
24	3	12,55	5,37	0,79	4,10
25	3	4,71	3,39	7,85	0,31
26	3	10,07	4,38	0,66	3,76
27	3	5,58	3,68	2,10	2,00
18	4	48,92	3,52	3,49	4,50

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. Cmax: concentração plasmática máxima.

Tabela VI: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (R)-(+)-hidroxifenilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	TMAX (h)	CMAX (ng/mL)
1	1	4,11	6,87	0,71	1,59
2	1	5,85	9,90	0,52	1,79
3	1	3,23	5,57	1,44	0,61
4	1	8,24	8,91	0,70	2,41
5	1	6,35	8,52	0,99	1,95
6	1	7,63	4,01	1,37	2,08
7	1	5,98	9,21	1,28	1,82
8	1	5,19	19,13	1,54	1,10
9	1	4,23	2,45	0,88	1,58
11	1	2,60	6,28	0,66	1,02
12	1	4,23	15,90	1,47	0,96
13	1	4,10	6,85	0,74	1,54
1	2	4,86	6,21	0,67	1,56
2	2	3,59	5,78	1,08	0,71
3	2	6,76	5,21	0,68	1,99
4	2	11,35	7,61	0,82	3,99
5	2	10,35	5,90	1,16	1,61
6	2	6,85	9,36	1,12	1,96
7	2	4,93	3,43	1,52	0,99
8	2	7,52	3,15	0,71	2,77
9	2	6,96	4,39	0,73	3,38
11	2	8,48	2,68	0,39	6,46
12	2	6,67	3,35	0,92	1,97
13	2	4,95	3,26	0,58	1,75
14	3	12,57	6,52	0,65	3,91
15	3	20,87	3,02	1,56	8,15
16	3	25,13	40,51	0,77	4,74
17	3	10,35	6,04	0,67	3,81
19	3	8,53	3,37	0,64	11,83
20	3	8,19	8,04	1,69	2,06
21	3	12,29	4,06	1,02	5,68
22	3	13,08	4,61	1,78	2,21
23	3	12,51	6,66	0,92	2,04
24	3	21,45	5,37	0,67	8,85
25	3	12,02	5,22	2,59	3,39
26	3	20,90	3,49	0,65	9,20
27	3	15,25	4,24	1,5	4,41
18	4	2,46	0,34	2,97	0,31

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. Cmax: concentração plasmática máxima.

Tabela VII: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-carvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	CL/F (L/h)	V2/F (L)	TMAX (h)	CMAX (ng/mL)	V1/F (L)
1	1	26,61	7,61	469,79	2725,30	0,91	9,99	507,449
2	1	46,35	6,40	269,68	911,63	0,81	16,41	286,839
3	1	23,22	5,99	538,25	2337,29	1,12	3,44	1681,289
4	1	102,67	3,54	121,75	338,52	0,67	84,02	73,285
5	1	28,77	3,00	434,49	620,12	0,37	11,83	926,272
6	1	25,83	9,55	483,98	1312,02	1,09	5,23	1727,599
7	1	51,97	9,63	240,51	50,68	0,66	38,61	275,726
8	1	29,87	4,17	418,42	1234,55	0,54	9,54	537,330
9	1	24,06	2,94	519,57	567,45	0,35	10,24	1141,504
11	1	32,03	4,10	390,23	1116,08	0,61	13,55	364,333
12	1	39,26	5,20	318,41	373,71	1,34	7,48	1131,857
13	1	32,80	6,33	381,04	1510,79	0,67	21,63	429,629
1	2	33,13	3,99	377,26	1164,14	0,54	7,04	925,200
2	2	27,28	6,86	458,17	2552,41	0,75	6,23	1412,524
3	2	33,25	25,70	375,99	3049,46	1,03	5,99	1723,919
4	2	34,99	3,49	357,22	641,61	0,47	25,35	374,542
5	2	40,33	7,21	309,98	2178,93	0,67	17,05	445,969
6	2	17,90	7,00	698,50	1967,13	0,76	5,79	1620,875
7	2	53,28	6,90	234,60	1075,00	1,04	8,48	956,033
8	2	32,77	2,67	381,48	951,76	0,44	24,83	181,405
9	2	29,51	3,15	423,62	925,67	0,68	11,00	467,960
11	2	31,40	3,97	398,10	1135,76	0,63	13,89	350,964
12	2	49,99	5,06	250,04	857,03	0,62	13,87	622,553
13	2	39,83	8,76	313,83	1363,12	1,24	6,74	1257,693
14	3	46,18	5,18	270,69	1164,67	0,89	14,51	399,690
15	3	51,54	3,44	242,52	2989,54	1,44	13,16	345,740
16	3	37,83	12,61	330,43	2266,85	0,83	10,52	447,619
17	3	32,96	14,35	379,20	4641,04	1,04	4,27	1166,993
19	3	29,84	5,35	418,92	1248,32	0,61	41,93	195,288
20	3	17,17	11,32	728,01	6222,26	1,54	2,63	1900,418
21	3	10,26	3,89	1218,19	2435,44	0,92	5,36	876,345
22	3	26,46	6,75	472,47	1246,53	1,52	5,34	961,450
23	3	203,95	5,29	61,29	290,53	0,52	61,99	83,221
24	3	37,58	4,68	332,59	706,13	0,33	43,38	240,888
25	3	113,90	4,85	109,75	215,73	0,70	58,29	123,318
26	3	39,93	2,90	313,05	452,54	0,33	55,73	175,932
27	3	38,51	5,20	320,55	710,5	0,68	16,55	220,722
18	4	25,09	4,28	173,46	1005,50	3,31	20,73	508,149

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. CL/F: Clearance aparente. V2/F: Volume de distribuição periférico aparente V1/F: Volume de distribuição central aparente. Cmax: concentração plasmática máxima.

Tabela VIII: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-O-desmetilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	TMAX (h)	CMAX (ng/mL)
1	1	1,87	12,13	1,08	0,44
2	1	3,24	4,27	0,34	2,09
3	1	4,17	7,97	1,27	0,60
4	1	9,58	14,51	0,51	2,50
5	1	1,70	4,19	0,60	0,72
6	1	2,96	1,81	1,26	0,80
7	1	5,09	6,23	0,85	2,60
8	1	11,16	9,63	0,38	2,55
9	1	3,14	6,60	0,56	1,32
11	1	4,82	3,34	0,41	2,13
12	1	7,98	53,26	1,04	1,36
13	1	1,88	12,52	1,08	0,44
1	2	2,18	15,25	0,89	0,52
2	2	1,90	7,30	1,19	0,40
3	2	5,27	5,53	1,40	1,09
4	2	8,46	12,77	0,87	1,91
5	2	2,84	3,95	0,63	2,46
6	2	4,04	1,69	0,84	1,33
7	2	8,11	5,27	1,24	1,66
8	2	7,60	2,66	0,56	3,04
9	2	3,71	3,23	0,66	1,89
11	2	4,80	3,38	0,42	2,06
12	2	7,05	13,76	0,68	1,41
13	2	2,19	4,30	0,98	0,49
14	3	2,70	4,05	1,09	0,11
15	3	4,01	5,67	1,40	0,46
16	3	1,36	1,17	0,77	0,64
17	3	1,70	13,89	0,88	0,21
19	3	2,59	15,69	0,65	0,22
20	3	1,37	8,98	1,57	0,33
21	3	1,66	7,00	0,95	0,68
22	3	3,26	6,84	1,50	0,66
23	3	3,70	7,75	0,84	0,85
24	3	2,96	4,99	0,62	1,42
25	3	2,11	7,31	2,63	0,52
26	3	2,76	5,77	0,45	1,47
27	3	2,54	5,14	1,15	0,50
18	4	21,05	6,63	3,83	2,16

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. Cmax: concentração plasmática máxima.

Tabela IX: Valores individuais dos parâmetros farmacocinéticos do (S)-(-)-hidroxifenilcarvedilol obtidos no programa WinNonLin versão 4.0

ID	OCC	AUC (ng h/mL)	T1/2 (h)	TMAX (h)	CMAX (ng/mL)
1	1	1,27	10,26	0,85	0,34
2	1	1,14	6,35	0,33	0,71
3	1	1,01	8,21	1,40	0,19
4	1	2,85	5,03	0,34	1,45
5	1	1,74	8,40	0,75	0,48
6	1	1,50	5,98	1,11	0,39
7	1	2,77	9,67	0,81	1,44
8	1	1,23	2,84	0,27	0,87
9	1	1,55	28,94	0,59	0,44
11	1	0,87	4,92	0,40	0,35
12	1	1,36	2,26	1,27	0,30
13	1	1,27	10,35	0,85	0,34
1	2	0,82	2,66	0,62	0,46
2	2	0,74	9,21	1,16	0,22
3	2	2,36	9,90	1,01	0,56
4	2	2,13	13,23	0,76	0,59
5	2	2,78	10,16	1,03	0,38
6	2	1,65	6,68	0,88	0,50
7	2	2,39	19,19	1,56	0,31
8	2	1,66	3,06	0,58	0,81
9	2	1,93	6,68	0,68	0,87
11	2	0,86	4,94	0,43	0,35
12	2	1,73	4,44	0,80	0,52
13	2	0,81	2,66	0,63	0,41
14	3	7,09	11,92	1,08	1,13
15	3	8,90	4,85	1,48	3,51
16	3	4,98	5,13	0,65	3,85
17	3	5,11	8,02	0,68	1,41
19	3	6,15	1,66	0,69	0,57
20	3	6,86	2,90	1,55	2,72
21	3	7,58	4,71	1,05	2,91
22	3	5,82	10,30	1,66	0,76
23	3	3,90	5,57	0,87	0,93
24	3	15,75	6,10	0,54	7,47
25	3	7,40	7,02	0,70	1,54
26	3	14,67	4,07	0,40	7,97
27	3	8,01	5,00	1,15	2,15
18	4	1,88	3,13	3,24	0,22

OCC: Ocasão: 1: Voluntários sadios CYP2D6 rápidos; 2: Voluntários sadios comedicionados; 3: Portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em tratamento com glibenclamida e metformina. 4: Portador de diabetes *mellitus* tipo 2 CYP2D6 lento. AUC: Área sob a curva concentração plasmática vs tempo. T1/2: Meia-vida. Cmax: concentração plasmática máxima.