UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva
do metoprolol em ratos

Fernanda Silva Graciani

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva
do metoprolol em ratos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia
Aluno: Fernanda Silva Graciani
Orientador: Prof. Dr. José Salvador Lepera

Ribeirão Preto
2009

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Graciani, Fernanda Silva

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol em ratos. Ribeirão Preto, 2009.

77 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Lepera, José Salvador.

1. Metoprolol. 2. Etilbenzeno. 3. Enantiômeros. 4. Farmacocinética

FOLHA DE APROVAÇÃO

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol em ratos

Autor: Fernanda Silva Graciani

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Toxicologia.
Área de Concentração: Toxicologia

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho apresentado e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/____/2009

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família...

Aos meus pais Domingos e Cecília, por tudo que eles fizeram, desde o necessário até o impossível, assim, consegui chegar até aqui.

Aos meus irmãos Alexandre e Eduardo pelo amor e carinho.

À minha cunhada Ana Paula, por trazer mensagens positivas nos momentos em que mais precisei.

Ao meu anjo Gabriel, pela paciência, e por fazer do meu trabalho o seu também, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

À família do meu noivo, pelo carinho.

Aos meus verdadeiros amigos.

Agradecimento Especial

Ao **Prof. Dr. José Salvador Lepera**, pela orientação, amizade,
paciência, confiança e ensinamentos.

Agradecimentos

À minha amiga **Juciane**, pela ajuda, amizade, carinho e conhecimentos trocados.

À amiga **Vanessa**, pelo companheirismo, amizade e ajuda nos problemas com as análises.

Aos meus amigos de laboratório **Ana Leonor, Bruno, Carolina Silva, Carolina Vieira, Daniel, Estela, Flávia, Josiane, Marcel, Natália, Natalícia e Teresa**, pela grande amizade, convivência e ajuda.

À **Maria Paula**, pelos ensinamentos e correta utilização dos equipamentos do laboratório.

Ao querido **Natalino**, pela alegria e grande ajuda prestada para melhor andamento no laboratório.

Aos funcionários do laboratório de Toxicologia da FCFAR-UNESP, **Bete, Maria e Valéria**, pela grande ajuda nos experimentos.

Aos colegas da pós graduação, docentes e funcionários da **Faculdade de ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP**, pela ajuda que, de alguma forma, tornou a jornada mais fácil.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

RESUMO

GRACIANI, F. S. **Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol em ratos**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Considerando que o metoprolol é metabolizado preferencialmente pelos CYP3A e CYP2D e que o etilbenzeno é um indutor do CYP3A em ratos, o presente estudo visa investigar a influência da exposição ao etilbenzeno, por via inalatória, na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do metoprolol. Foram utilizados ratos Wistar machos, tratados com dose única de 15 mg/kg ou 30mg/kg de metoprolol racêmico (gavagem). Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo dois controles (15 e 30mg/kg) e dois expostos ao etilbenzeno em concentrações de 434mg/m³ e 1736mg/m³ e tratados com 15mg/kg de metoprolol. Os animais foram expostos ao etilbenzeno durante 6 horas/dia, por 5 dias consecutivos, em câmara de exposição do tipo somente pelo nariz. As amostras seriadas de sangue (n=6 animais por tempo de coleta) foram coletadas até 6 horas após a administração do metoprolol. Os enantiômeros foram analisados no plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e a farmacocinética do metoprolol foi avaliada empregando modelo bicompartimental. O metoprolol na dose de 30mg/kg exibe farmacocinética não linear, com acúmulo plasmático de ambos os enantiômeros do metoprolol e redução do *clearance* do enantiômero R-(+)-metoprolol (39,91 vs 78,37 L/h/kg) quando comparado ao grupo de animais tratados com a dose de 15mg/kg. A farmacocinética do metoprolol na dose de 15mg/kg é linear e não enantiosseletiva. A exposição ao etilbenzeno inalado na concentração de 434mg/m³ (1 LEO) não altera a farmacocinética de ambos os enantiômeros do metoprolol. A exposição ao etilbenzeno inalado na concentração de 1736mg/m³ (4 LEO) aumenta o *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol em aproximadamente 3 vezes (224,66 vs 78,37 L/h/kg e 213,62 vs 73,63 L/h/kg), respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol. O aumento do *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol no grupo de animais expostos ao etilbenzeno inalado na concentração de 1736mg/m³ (4 LEO) pode ser explicado pelo aumento na formação de ambos os enantiômeros dos metabólitos O-desmetilmetoprolol (AUC^{0-∞} 122,84 vs 61,57 ng/h/mL e 92,33 vs 58,56 ng/h/mL, respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-) e ácido O-desmetilmetoprolóico (AUC^{0-∞} 8592,0 vs 6812,5 ng/h/mL e 8733,0 vs 6787,0 ng/h/mL respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-). Os dados permitem inferir que ratos expostos durante 5 dias, 6h/dia, ao etilbenzeno na concentração de 4 vezes o LEO, mostram indução de maneira não enantiosseletiva no metabolismo de ambos os isômeros do metoprolol.

Palavras chave: etilbenzeno, metoprolol, enantiômeros, farmacocinética.

ABSTRACT

GRACIANI, F. S. **Influence of ethylbenzene on the enantioselective pharmacokinetics of metoprolol in rats.** 2009. 77f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Metoprolol is mainly metabolized by CYP3A and CYP2D and ethylbenzene is an inducer of CYP3A in rats. In view of these considerations, the objective of the present study was to investigate the influence of low-level inhalation exposure to ethylbenzene on the kinetic disposition and metabolism of metoprolol enantiomers. Male Wistar rats were received a single dose of 15 or 30 mg/kg racemic metoprolol by gavage. The animals were divided into 4 groups: two control groups (15 and 30 mg/kg) and two groups exposed to ethylbenzene at concentrations of 434 and 1736 mg/m³. The animals were exposed to ethylbenzene in a nose-only exposure chamber for 6 h/day during 5 consecutive days. Serial blood samples (n=6 animals per sampling time) were collected during the first 6 h after metoprolol administration. The isomers of metoprolol and its metabolites were analyzed in plasma samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Pharmacokinetic analysis was performed using a two-compartment model. Metoprolol administered at a dose of 30 mg/kg showed nonlinear pharmacokinetics, with plasma accumulation of both metoprolol enantiomers and a reduction in the clearance of R-(+)-metoprolol (39.91 vs 78.37 L/h/kg) when compared to the group receiving the dose of 15 mg/kg. The kinetic disposition of the enantiomers of metoprolol administered at a dose of 15 mg/kg was linear and non-enantioselective. Exposure to 434 mg/m³ ethylbenzene did not influence the pharmacokinetics of either metoprolol enantiomer. Exposure to 1736 mg/m³ ethylbenzene increased the clearance of both metoprolol enantiomers by approximately 300% (224.66 vs 78.37 L/h/kg and 213.62 vs 73.63 L/h/kg for the R-(+)- and S-(-)-metoprolol enantiomer, respectively). These changes in clearance might be explained by an increase in the formation of the enantiomers of the two metabolites O-demethylmetoprolol (AUC^{0-∞}: 122.84 vs 61.57 ng/h/mL and 92.33 vs 58.56 ng/h/mL for the R-(+)- and S-(-)- enantiomer, respectively) and O-demethylmetoprolol acid (AUC^{0-∞}: 8592.0 vs 6812.5 ng/h/mL and 8733.0 vs 6787.0 ng/h/mL). In conclusion, inhalation exposure of rats to ethylbenzene at a concentration of 1736 mg/m³ for 5 days, 6 h per day, resulted in the non-enantioselective induction of the metabolism of metoprolol.

Key words: ethylbenzene, metoprolol, enantiomers, pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolismo oxidativo do metoprolol em humanos.....	6
Figura 2.	Biotransformação do etilbenzeno no homem.....	10
Figura 3.	Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes.....	16
Figura 4.	Esquema do corpo da câmara de exposição a solventes (corte transversal, plano vertical).....	17
Figura 5.	Amostragem da atmosfera experimental para análise.....	18
Figura 6.	Detalhe de um animal sendo exposto no sistema.....	18
Figura 7.	Procedimento de extração líquido-líquido do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol.....	25
Figura 8.	Procedimento de extração líquido-líquido do ácido O-desmetilmetoprolóico.....	26
Figura 9.	Cromatograma referente à análise do etilbenzeno em ar por CG/DIC.....	30
Figura 10.	Representação da curva de calibração para etilbenzeno no ar.....	30
Figura 11.	Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do metoprolol e do O-desmetilmetoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma.....	32
Figura 12.	Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma.....	33
Figura 13.	Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-metoprolol e S-(-)-metoprolol em plasma de ratos.....	34
Figura 14.	Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-O-desmetilmetoprolol e S-(-)-O-desmetilmetoprolol em plasma de	

	ratos.....	34
Figura 15.	Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolólico e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma de ratos.....	35
Figura 16.	Curvas de calibração para a análise dos isômeros 1'S,2R- α -hidroximetoprolol, 1'S,2S- α -hidroximetoprolol, 1'R,2R- α -hidroximetoprolol e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol em plasma de ratos.	35
Figura 17.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os enantiômeros do metoprolol no grupo controle dose 30mg/kg (n= 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.....	36
Figura 18.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo controle dose 15mg/kg (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.....	38
Figura 19.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo exposto ao etilbenzeno 434 mg/m ³ (1 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.....	43
Figura 20.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo exposto ao etilbenzeno 1736 mg/m ³ (4 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.....	48
Figura 21.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo para os enantiômeros R-(+)- S-(-) metoprolol nos grupos controle 15mg/kg e 30mg/kg. Dados apresentados como mediana (n= 6/tempo de colheita).....	53
Figura 22.	Curvas concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos isômeros R-(+)- do metoprolol e metabólitos para os grupos controle, exposto ao etilbenzeno 434 mg/m ³ (1 LEO) e exposto ao etilbenzeno 1736	

mg/m³ (4 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas..... 55

Figura 23. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros S-(-)-do metoprolol e metabólitos para os grupos controle, exposto ao etilbenzeno 434 mg/m³ (1 LEO) e exposto ao etilbenzeno 1736 mg/m³ (4 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Determinação do etilbenzeno na câmara de exposição.....	31
Tabela 2.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo controle tratado com 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	37
Tabela 3.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita...	39
Tabela 4.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-O-desmetilmetoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	40
Tabela 5.	Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α -hidroximetoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	41
Tabela 6.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	42
Tabela 7.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo exposto a 434 mg/m ³ (1 LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico.	

	Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	44
Tabela 8.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-O- desmetilmetoprolol no grupo exposto a 434 mg/m ³ (1LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	45
Tabela 9.	Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α-hidroximetoprolol no grupo exposto a 434 mg/m ³ (1LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	46
Tabela 10.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O- desmetilmetoprolóico no grupo exposto a 434 mg/m ³ (1LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	47
Tabela 11.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)- metoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m ³ (4 LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	49
Tabela 12.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-o- desmetilmetoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m ³ (4LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	50

Tabela 13.	Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α -hidroximetoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m ³ (4 LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	51
Tabela 14.	Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolólico no grupo exposto a 1736mg/m ³ (4LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.....	52
Tabela 15.	Disposição cinética do R-(+)-MET nos grupos controle tratado com 15mg/kg e 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita de cada grupo.....	54
Tabela 16.	Disposição cinética do S-(-)-MET nos grupos controle tratado com 15mg/kg e 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita de cada grupo.....	54
Tabela 17.	Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro AUC ^{0-∞} (ng.h/mL).....	57
Tabela 18.	Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro Cmax (ng/mL).....	57
Tabela 19.	Avaliação da indução enzimática no metabolismo do	

metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro $t_{1/2}$ (h)..... 58

Tabela 20. Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o Cl/f (L/h/kg)..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists

AODM - Ácido O-desmetilmetoprolóico

α - Constante de velocidade

α -OHM - α -hidroximetoprolol

AUC - Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

AUC^{0-∞} - Área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo zero até o infinito

β - Constante de velocidade de eliminação

CD - Constante de dessorção

Cl/f - *Clearance* total aparente

CG - Cromatografia Gasosa

C_{max} - Concentração plasmática máxima

CV - Coeficiente de variação

CYP - Sistema citocromo P450

EBZ - Etilbenzeno

h - Horas

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IC 95% = intervalo de confiança 95%

Kg - Kilograma

LEO - Limite de exposição ocupacional

MET - Metoprolol

Mr - Massa recuperada de dessorção

n - Número de amostras analisadas

NaOH - Hidróxido de sódio

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health

NOES - Nose only exposure system

ODM - O-desmetilmetoprolol

PI - Padrão Interno

P_{mol} - $10^{-12}M$

R^2 - Coeficiente de determinação

STEL - Short Term Exposure Limit

$t^{1/2}$ - meia-vida

$t^{1/2}_a$ - Meia-vida de absorção

$t^{1/2}_\beta$ - meia-vida de eliminação

TLV - Threshold Limit Values

TWA - Time Weighted Average

V_d/f - Volume aparente de distribuição

VS - *Versus*

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3. Exposição ao etilbenzeno	16
3.2 Análise de etilbenzeno na atmosfera da câmara <i>Nose Only Exposure System</i>	19
3.2.1 Materiais	19
3.2. Equipamento acessório	19
3.2.3 Método	20
3.2.4 Preparação da amostra para a análise do etilbenzeno	20
3.3 Protocolo experimental	20
3.3.1 Grupo controle (30mg/kg)	21
3.3.2 Grupo controle (15mg/kg)	21
3.3.3 Grupos expostos ao etilbenzeno (434 e 1736mg/m ³)	22
3.4 Análise enantiosseletiva do metoprolol em plasma	22
3.4.1 Reagentes e soluções padrão	23

3.4.2 Equipamentos.....	23
3.4.3 Preparo da amostra.....	24
3.4.3.1 Metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma de ratos.....	24
3.4.3.2 Ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma de ratos.....	25
3.4.4 Curvas de calibração.....	26
3.5 Análise farmacocinética.....	27
3.6 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Análise do etilbenzeno na atmosfera da câmara NOES.....	30
4.1.1 Curva de calibração.....	30
4.1.2 Determinação do etilbenzeno na câmara de exposição.....	31
4.2 Análise estereosseletiva do metoprolol e seus principais metabólitos em plasma de ratos.....	31
4.2.1 Análise Cromatográfica.....	31
4.2.2 Curvas de calibração.....	33
4.3 Análise farmacocinética.....	36
4.3.1 Grupo controle dose 30mg/kg.....	36
4.3.2 Grupo controle dose 15mg/kg.....	38
4.3.3 Grupo exposto ao etilbenzeno 434 mg/m ³ (1 LEO).....	43
4.3.4 Grupo exposto ao etilbenzeno 1736 mg/m ³ (4 LEO).....	48
4.3.5 Grupo controle dose 15mg/kg vs grupo controle dose 30mg/kg.....	53
4.3.6 Grupo controle dose 15mg/kg vs grupo exposto ao etilbenzeno 434 mg/m ³ e 1736 mg/m ³	55

5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	68
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXO.....	76
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara sobre o protocolo experimental.....	77

1 *I*NTRODUÇÃO

Os isômeros ópticos que possuem um ou mais centros quirais, um contendo uma estrutura que é a imagem especular da estrutura do outro, são chamados de enantiômeros ou antípodas ópticos. Um par de enantiômeros apresenta todas as propriedades físicas e químicas iguais, com exceção do desvio do plano da luz polarizada para a direita (dextrógiro) ou esquerda (levógiro) (SIMONYI; GAL; TESTA, 1989; TUCKER; LENNARD, 1990).

Alguns processos farmacocinéticos, como a absorção pelo trato digestório, a distribuição aos tecidos e a filtração glomerular são dependentes das propriedades físico-químicas do fármaco e não são responsáveis pela expressão da enantiosseletividade, dado que possuem as mesmas características de solubilidade. Porém, o fenômeno é comumente observado em situações de interação do fármaco com macromoléculas quirais, tais como na absorção dependente de carreadores, na ligação às proteínas plasmáticas, nos processos de secreção biliar e renal, e no metabolismo. As pesquisas já realizadas indicam que o metabolismo é capaz de introduzir o maior grau de enantiosseletividade na disposição cinética de fármacos quirais (TUCKER; LENNARD, 1990 KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; BROCKS, 2006).

Os estudos de metabolismo de fármacos quirais tem permitido a identificação das principais enzimas de fase I e fase II responsáveis pelas conversões metabólicas. Porém, a grande variabilidade individual no metabolismo destes fármacos, observada em humanos, representa um obstáculo importante porque pode levar a resultados indesejáveis e difíceis de prever, como a variação no intervalo terapêutico, a ausência do efeito terapêutico e a manifestação de efeitos tóxicos em sub-populações específicas. Entre as causas para essa variação estão o polimorfismo genético, os estados fisiológicos e as doenças, além da interação entre

fármacos (TUCKER; LENNARD, 1990; KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; ZUBER; ANZENBACHEROVÁ; ANZENBACHER, 2002; BROCKS, 2006).

No que tange à interferência gerada por fatores ambientais e, em particular, pela exposição ocupacional a agentes químicos, praticamente nada foi investigado.

A indução e a inibição enzimática são fatores que podem afetar os enantiômeros de um fármaco quiral em diferentes extensões, sendo mais expressivas quando os enantiômeros sofrem biotransformação através de diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades (KARIN, 1996; KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; MEHVAR; REYNOLDS, 1996; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; HUTZLER; TRACY, 2002).

O metabolismo desempenha um papel importante também na modulação da toxicidade de medicamentos. Dentre os diversos sistemas enzimáticos responsáveis pela metabolização, o principal em termos de versatilidade catalítica é o citocromo P450 (CYP) (PARKINSON, 2001).

O CYP é uma hemoproteína com várias isoformas distintas e presente em altas concentrações no fígado, embora seja encontrado em diferentes tecidos (NAKAJIMA; AOYAMA, 2000). Geralmente, a principal função do CYP é converter moléculas lipofílicas em compostos mais polares, que podem ser mais facilmente eliminados do organismo (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999).

O conhecimento das bases moleculares para a indução ou inibição do CYP tem mostrado grande progresso. Uma avaliação dos mecanismos de eliminação metabólica de 315 diferentes fármacos revelou que 56% deles são eliminados primariamente pela ação de isoformas do CYP. Dentre elas, o CYP3A4 é o sistema mais importante, sendo responsável pela eliminação de 50% dos fármacos, seguindo-se o CYP2D6 com 20% e o CYP2C9/19 com 15%, além da participação do

CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2 e outros não identificados. Todas essas isoformas podem ser induzidas, exceto o CYP2D6, ou inibidas por diferentes substâncias químicas alterando o metabolismo de um fármaco quiral em diferentes extensões (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; HUTZLER; TRACY, 2002).

O metoprolol [1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol] é um antagonista seletivo do receptor β adrenérgico. Como outros bloqueadores de receptores β adrenérgicos, o metoprolol tem um centro assimétrico em sua cadeia, e a forma do produto disponível na clínica é uma mistura racêmica dos enantiômeros S-(-)- e R-(+)- (SPAHN et al., 1989; LI; COOPER; CÔTÉ, 1995; MISTRY; LESLIE; EDDINGTON, 2001). O metoprolol é usado para o tratamento da angina pectoris, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares (FOSTER; MACDONALD, 1999). O enantiômero S-(-)-metoprolol é o que expressa maior ação no bloqueio do receptor β_1 adrenérgico. A afinidade do S-(-)-metoprolol pelo receptor β_1 adrenérgico é aproximadamente 500 vezes maior do que a afinidade do R-(+)-metoprolol (TUCKER; LENNARD, 1990; LAURENTI-KENESI et al., 1993).

Mais de 90% da dose oral do metoprolol administrada a humanos é absorvida no trato digestório (REGARDH; JOHNSON, 1980). Desta porcentagem, apenas cerca de 3% é excretada inalterada na urina e aproximadamente 95% da dose é eliminada por metabolismo oxidativo (LENNARD; TUCKER; WOODS, 1986).

Apesar da completa absorção gastrointestinal, em razão da alta eliminação pré-sistêmica somente 50% da dose atinge a circulação sob a forma inalterada (REGARDH; JOHNSON, 1980).

Mostafavi e Foster (2000) ainda reportam que o metoprolol é rapidamente absorvido também em ratos e que o C_{max} é atingido em 12 minutos após a

administração do fármaco racêmico, para ambos os enantiômeros. Além disso, a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) mostra-se similar (35min) para ambos os enantiômeros R-(+)- e S-(-), indicando que o rato é um metabolizador extensivo do metoprolol, pois a meia-vida de eliminação do R-(+)-metoprolol é maior que a do S-(-)-metoprolol em pacientes metabolizadores pobres, enquanto que, em pacientes metabolizadores extensivos do metoprolol não são observadas diferenças. Portanto, o rato demonstra ser um modelo animal com comportamento semelhante ao da população caucasiana fenotipada como metabolizadora extensiva do metoprolol.

O metoprolol é metabolizado principalmente por três vias oxidativas (Figura 1), que são: a O-desmetilação com subsequente e rápida oxidação, a hidroxilação alifática e a desaminação oxidativa (LARSSON et al., 1984).

Figura 1. Metabolismo oxidativo do metoprolol em humanos. (BORG et al., 1975; LEEMANN; DEVI; DAYER, 1993)

A formação do metabólito α-hidroximetoprolol é dependente da atividade geneticamente determinada do CYP2D6 e relaciona-se com o fenótipo de oxidação tipo debrisoquina/esparteína (LENNARD; TUCKER; WOODS, 1986).

A via quantitativamente mais importante é a oxidação do produto da O-desmetilação resultando na formação do ácido O-desmetilmetoprolólico, e corresponde a eliminação de 65% da dose em humanos (BORG et al., 1975).

A velocidade de α -hidroxilação excede a velocidade de O-desmetilação em aproximadamente 30% em microsossomos de fígado de rato. No entanto em microsossomos de fígado humano a velocidade de O-desmetilação excede a de α -hidroxilação em 7 a 12 vezes. A enantiosseletividade é similar entre microsossomos de fígado de rato e microsossomos de fígado humano: ambas as preparações mostram pouca ou nenhuma enantiosseletividade no processo de α -hidroxilação e leve preponderância na formação do R-(+)-O-desmetilmetoprolol (MURTHY et al., 1990). A via de O-desmetilação do metoprolol em ratos é dependente do CYP2D e CYP3A (BORALLI, 2006).

A presença de agentes químicos no cotidiano humano é praticamente ubíqua, gerando muitas possibilidades de exposição que podem repercutir no metabolismo dos fármacos.

Atualmente estão recenseadas no *Toxline – ChemIDplus*, base de dados da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, cerca de 380.000 substâncias com as quais se produzem milhões de misturas e formulações (UNITED STATES, 2008)

Milhões de pessoas expõem-se cotidianamente a agentes químicos no ambiente de trabalho, tornando imprescindível a vigilância do risco destas exposições à saúde. Essa vigilância é feita com base nos Limites de Exposição Ocupacional (LEO), que são guias ou padrões para manter as exposições em níveis que possam ser considerados aceitáveis. O LEO é proposto por diversas instituições, entre as quais, é referência mundial a ACGIH - American Conference of Governmental Industrial Hygienists, associação de Higienistas Ocupacionais com sede nos Estados Unidos, que é proponente dos TLVs - Threshold Limit Values, sua marca registrada (ACGIH, 2006).

Posto que as concentrações flutuam ao longo da jornada de trabalho e que é necessária certa distinção entre efeitos críticos, do ponto de vista de sua repercussão sobre o indivíduo, são propostas categorias de LEO (RAPPAPORT, 2005).

Assim, a ACGIH propõe um limite para a média ponderada pelo tempo das concentrações (TLV-TWA - *Time Weighted Average*) para balizar a exposição média de uma jornada de trabalho de 8 horas. Dado que o limite é para a média ponderada da concentração, fica implícita a aceitação de excursões da concentração a valores superiores ao valor limite, fato que é controlado pelos limites para exposição de curta duração (TLV STEL - *Short Term Exposure Limit*), valores que podem repetir-se até quatro vezes durante a jornada, com máximo de 15 minutos de duração e a intervalos mínimos de 1 hora, e mantida a média ponderada da jornada abaixo do TLV-TWA. Finalmente, para as substâncias cujo efeito crítico é de importância expressiva, são propostos os limites teto (TLV *ceiling*), os quais não devem ser atingidos em nenhum momento da jornada de trabalho (ACGIH, 2006).

Embora existam poucos estudos na literatura os efeitos dos solventes orgânicos na atividade do CYP podem ser relevantes em razão da importância dessas enzimas no metabolismo de medicamentos (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999).

A exposição experimental a vapores de solventes pode ser realizada em câmaras de dois tipos: as que expõem todo o animal e aquelas em que a exposição se dá apenas pelo nariz (NOES - *Nose Only Exposure System*). As vantagens da exposição apenas pelo nariz estão em utilizar menor quantidade de material, produzir exposição mais uniforme entre os animais, ser mais facilmente controlada e evitar a penetração do solvente por outras vias. No entanto, há a desvantagem da

restrição no tempo de experimentação, devido ao estresse provocado pela contenção do animal, que em geral é limitado ao máximo de seis horas (HOLANDER, 1988; KENNEDY; VALENTINE, 1994;).

Em câmaras para exposição em que animal inteiro é exposto, são necessários grandes volumes de atmosfera controlada. Além disso, os animais tendem a evitar a exposição indesejada introduzindo o nariz entre os pelos de outros animais contidos na mesma câmara, ou sob os próprios pelos quando isolados, além de haver ingestão de material depositado no corpo, pelo comportamento de auto-limpeza (HOLANDER, 1988; KENNEDY; VALENTINE, 1994).

O etilbenzeno é um líquido incolor e de odor aromático que ocorre naturalmente no petróleo. É empregado como solvente, e na indústria do plástico e da borracha, sendo a principal matéria prima para produção do estireno. Usualmente ele está presente em misturas complexas como os tóneres e a gasolina automotiva e de aviação, mas pode ser parcela importante de solventes com pureza adequada ao uso industrial como o xileno, por exemplo, que pode conter cerca de 20% de etilbenzeno. É um solvente utilizado em grande volume, estimando-se que supere os 3,7 milhões de toneladas anuais, dos quais 90% são destinados à produção de estireno e, o restante, ao uso como solvente e para produção de outras moléculas orgânicas como o divinilbenzeno, acetofenona e acetato de celulose. (HENDERSON, 2005; ACGIH, 2006). Portanto, há grande diversidade de oportunidades de exposição ocupacional.

Lepera e Colacioppo (2005) evidenciaram a presença do etilbenzeno nos tóneres de tintas automotivas, em que se encontrou o etilbenzeno em 100% das amostras de ar coletadas na zona respiratória dos pintores, independentemente do tipo de tinta utilizada na operação.

O etilbenzeno é absorvido principalmente através das vias respiratória e dérmica, e por possuir características de rápida volatilização, a via respiratória é a mais importante no ambiente ocupacional, sendo sua retenção de 56 a 64%. A principal via de eliminação é através da metabolização enzimática e a fração eliminada inalterada pelo ar exalado é quantitativamente insignificante (ACGIH, 2006).

O etilbenzeno é extensivamente biotransformado por oxidação na cadeia lateral, tendo por principais produtos o ácido mandélico e o fenilglicoxílico, que são excretados na urina e correspondem, respectivamente, a 65% e 25% da dose absorvida, como mostra a Figura 2. Humanos e animais expostos ao etilbenzeno exibem ainda os ácidos hipúrico, fenacetúrico, traços de etilfenóis e de hidroxiacetofenonas como metabólitos secundários. O ácido mandélico e o etilbenzeno no ar exalado podem ser utilizados como indicadores biológicos da exposição ocupacional ao solvente (HENDERSON, 2005; ACGIH, 2006).

Figura 2. Biotransformação do etilbenzeno no homem (ACGIH, 2006).

Estudos realizados com microsossomos hepáticos humanos observam que, a primeira etapa da biotransformação do etilbenzeno, que é a conversão a feniletanol, é mediada pelos CYP 1A2, 2B6, 2C19, 2D6, 2E1, 2C9 e 3A4, sendo mais ativas as isoformas 1A2 e 2B6, respectivamente com 43 e 48 pmoles de etilbenzeno biotransformados por minuto e por pmol de proteína (SANS et al., 2004).

Segundo Serron, Dwivedi e Backes (2000), há aumento nos níveis das proteínas correspondentes ao CYP3A2 de 67%, ao CYP2E1, de 80% e ao CYP2B, de 20 vezes, em ratos tratados com dose única de etilbenzeno (10 mmol/kg, via intraperitoneal)

Após uma injeção diária de 10mmol/kg de etilbenzeno em ratos, via intraperitoneal, por 1 a 3 dias, Yuan et al., (1994, 1997) relatam indução dos CYP 2B1, 2B2, 2C11, 2E1, 3A e 3A2, e observam que a modulação ocorre de forma diferente para as diferentes isoformas, quanto à intensidade, ao tempo, e aos níveis de mRNA e de expressão protéica.

A toxicidade aguda e crônica do etilbenzeno é baixa para animais e humanos, com DL₅₀ oral para ratos estimada de 3,5 g/Kg a 4,7g/Kg de peso corpóreo. Por via inalatória, a CL₅₀ é estimada em 19,7 g/m³ por 4 horas e a exposição a 1,07 g/m³ durante 6h ao dia, por 5 dias por semana, durante 13 semanas é estimada como NOAEL - Non Observed Adverse Effect Level (HENDERSON, 2005).

Em humanos são relatadas as ações irritante neurossensorial e depressora do Sistema Nervoso Central, e os limites de exposição ocupacional propostos, de 100 ppm (434 mg/m³) para a média ponderada pelo tempo (TLV-TWA®) e de 125 ppm (543 mg/m³) para exposições de curta duração (TLV-STEL®), visam minimizar o potencial de risco para tais manifestações (ACGIH, 2006).

Pouco é conhecido sobre os efeitos potenciais dos solventes sobre os

sistemas biotransformadores, em particular sobre a atividade do CYP e, consequentemente, no metabolismo de medicamentos quirais dependente desse sistema enzimático.

Assim, considerando que o metabolismo do metoprolol é dependente do CYP3A dentre outras enzimas e que o etilbenzeno é apontado como indutor do CYP3A, o presente estudo visa investigar a influência do etilbenzeno na farmacocinética estereosseletiva do metoprolol administrado a ratos sob forma racêmica.

2 OBJETIVOS

O objetivo do estudo é investigar a influência do etilbenzeno na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol, em ratos expostos ao solvente por inalação, em câmara de exposição NOES – Nose Only Exposure System.

Os objetivos específicos incluem:

- 1- Determinar a dose de metoprolol racêmico, administrada a ratos por gavagem, que não resulta em saturação enzimática.
- 2- Avaliar a enantiosseletividade na disposição cinética e no metabolismo do metoprolol em ratos tratados com dose única do fármaco sob a forma racêmica.
- 3- Avaliar a influência do etilbenzeno inalado na disposição cinética dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em ratos.
- 4- Avaliar a influência da concentração de etilbenzeno inalado na disposição cinética dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em ratos.

3 *M*ATERIAIS E *M*ÉTODOS

3.1 Exposição ao etilbenzeno

No presente estudo, utilizou-se uma câmara de exposição do tipo NOES, dotada de onze portas, dispostas radialmente no mesmo plano. Assim, foi possível expor até dez animais simultaneamente, considerando a reserva de uma das portas para amostragens da atmosfera experimental e verificação da concentração e de sua estabilidade. Esquemáticamente, o sistema é constituído dos elementos representados na Figura 3.

O suprimento de ar foi propiciado por um compressor livre de óleo, umidificado por borbulhamento, sendo que as vazões de arraste e de diluição foram controladas por orifícios críticos.

Figura 3. Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes.

A geração do vapor foi realizada por injeção contínua do etilbenzeno diretamente no fluxo de ar, seguindo-se a adução de fluxo de diluição e introdução do fluxo resultante em sentido ascendente na câmara de exposição. A Figura 4 mostra o desenho esquemático da câmara de exposição.

Figura 4. Esquema do corpo da câmara de exposição a solventes (corte transversal, plano vertical). (1) cone para conexão do dispositivo de contenção do animal (2) tubo para levar os vapores à zona respiratória do animal, (3) tirante de fixação da tampa da câmara externa, (4) base do conjunto, (5) câmara externa – exaustão, (6) tampa da câmara interna, (7) câmara interna-alimentação dos vapores, (8) exaustão, (9) entrada do vapor.

A amostragem da atmosfera foi realizada durante o período experimental para permitir a estimativa adequada da exposição total ao etilbenzeno. Os meios de coleta foram posicionados de maneira similar à do nariz dos animais, e foram constituídos de tubos de carvão ativo 100/50 mg. As coletas foram realizadas em fluxo de 100 ml/min, com bombas de amostragem dotadas de controle micro-processado de vazão, e as análises foram realizadas por cromatografia em fase gasosa.

Na Figura 5 pode ser observado o posicionamento do tubo de coleta na porta da câmara de exposição e, na Figura 6, o detalhe de um animal sendo exposto.

Figura 5. Amostragem da atmosfera experimental para análise.

Figura 6. Detalhe de um animal sendo exposto no sistema.

3.2 Análise de etilbenzeno na atmosfera da câmara *Nose Only Exposure System*

A análise do etilbenzeno no ar foi realizada segundo o método validado por Farias (2007).

3.2.1 Materiais

O etilbenzeno e o isopropilbenzeno (cumeno) grau PA foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o dissulfeto de carbono foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Os gases utilizados na cromatografia em fase gasosa (nitrogênio, hidrogênio e ar sintético) foram obtidos da Air Liquide SA.

Os tubos de carvão ativo 100/50mg foram obtidos da SKC[®] Inc (Eighty Four, PA, USA).

3.2.2 Equipamentos e acessórios

O cromatógrafo a gás modelo CG 500 A, Instrumentos Científicos CG Ltda, foi equipado com injetor capilar tipo *split/splitless*, detector por ionização em chama, integrador eletrônico (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA; HP3396 II) e coluna capilar de sílica fundida Supelcowax 10 (Polietilenoglicol) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm.

As bombas de amostragem microprocessadas modelo Pocket Pump (Eighty Four, PA, USA) foram previamente calibradas para a vazão de 100 mL/min.

3.2.3 Método

3.2.4 Preparação da amostra para análise do etilbenzeno

Os tubos coletores foram abertos para a transferência da seção frontal do meio de coleta (100 mg) para frascos com septo de teflon. A cada frasco foi adicionado 1 mL de dissulfeto de carbono contendo isopropilbenzeno como padrão interno na concentração de 2µL/mL. Os frascos foram ocasionalmente agitados por um período de trinta minutos para o procedimento de dessorção (NIOSH, 2003).

A curva de calibração foi construída (em triplicata) nas concentrações de 736,4; 1472; 2945 e 4410 mg/m³, correspondentes respectivamente a 1,6; 3,4; 6,8 e 10 vezes o LEO, através da diluição de volumes apropriados de etilbenzeno diretamente na solução de dessorção contendo o padrão interno.

As análises foram executadas em cromatógrafo a gás, com detector por ionização em chama, injetando-se 1 µL de amostra, nas seguintes condições cromatográficas:

- Gás de arraste: Hidrogênio, na vazão de 1 mL/min
- Temperatura do injetor: 180° C
- Temperatura do detector: 220° C
- Temperatura do forno: 70° C (modo de operação isotérmica)
- divisão de amostra na razão de 1:70

3.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, CEP/FCF nº 05/2007 (Anexo A).

Foram utilizados ratos machos Wistar, de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério

Central do Campus de Botucatu da UNESP. Antes dos experimentos, os animais permaneceram durante 3 dias no Biotério da disciplina de Toxicologia para adaptação, com livre acesso a ração e água. Os animais foram distribuídos em 4 grupos, sendo dois controles com 60 ratos, nas doses de 15mg/kg e 30mg/kg e dois expostos a diferentes concentrações de etilbenzeno, também com 60 ratos para cada tratamento.

3.3.1 Grupo controle (30mg/kg)

Os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 h/dia durante 5 dias, expostos apenas ao ar. No quinto dia da exposição, os animais em estado de jejum de 12 horas receberam, por gavagem, metoprolol racêmico dissolvido em água na dose de 30mg/Kg. A seguir, os animais foram imediatamente colocados na câmara de exposição, expostos apenas ao ar. As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas por decapitação nos tempos zero, 2, 5, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração. A heparina (Liquemine[®] Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil) foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados 6 animais para cada tempo de coleta. Os plasmas obtidos foram armazenados a – 70°C até a análise.

3.3.2 Grupo Controle (15mg/kg)

Os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 h/dia durante 4 dias, expostos apenas ao ar. No quinto dia da exposição, os animais em estado de jejum de 12 horas receberam, por gavagem, metoprolol racêmico dissolvido em água na dose de 15mg/kg. A seguir, os animais foram imediatamente colocados na câmara de exposição até a coleta do sangue. As

amostras de sangue (5 mL) foram coletadas por decapitação nos tempos zero, 2, 5, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração. A heparina foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados 6 animais para cada tempo de coleta. Os plasmas obtidos foram armazenados a – 70°C até a análise.

3.3.3 Grupos expostos ao etilbenzeno (434 e 1736mg/m³)

Os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 h/dia durante 5 dias, expostos ao etilbenzeno apenas pelo nariz (NOES). No quinto dia da exposição, os animais em estado de jejum de 12 horas, receberam por gavagem, metoprolol racêmico dissolvido em água na dose de 15mg/kg. A seguir, os animais foram imediatamente colocados na câmara de exposição até a coleta do sangue. As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas por decapitação nos tempos zero, 2, 5, 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos após a administração. A heparina foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados 6 animais para cada tempo de coleta. Os plasmas obtidos foram armazenados a – 70°C até a análise.

As doses do solvente foram equivalentes a 1 e 4 vezes o TLV-TWA.

Grupo etilbenzeno 1 LEO: exposição ao etilbenzeno 434 mg/m³

Grupo etilbenzeno 4 LEO: exposição ao etilbenzeno 1736 mg/m³

3.4 Análise enantiosseletiva do metoprolol em plasma

A análise enantiosseletiva do metoprolol em plasma foi realizada segundo o método desenvolvido e validado por Boralli et al., (2005).

3.4.1 Reagentes e soluções padrão

As soluções estoque de metoprolol (tartarato de metoprolol 99%, Sigma, St. Louis, MO, EUA), O-desmetilmetoprolol (*p*-hidroxi-benzoato, Astra Hässle, Mölndal, Suíça) e α -hidroximetoprolol racêmicos (*p*-hidroxi-benzoato, Astra Hässle, Mölndal, Suíça) foram preparadas na concentração de 0,2 mg da base livre/mL de metanol. A partir destas soluções foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 2; 4; 8; 10; 20 e 40 μ g/mL de metanol.

A solução estoque do ácido O-desmetilmetoprolóico racêmico (cloridrato, Astra Hässle, Mölndal, Suíça) foi preparada na concentração de 0,44 mg de base livre/mL de metanol. A partir desta solução foram feitas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 11,04; 22,1; 44,17; 88,34; 110,4; 132,5 e 220,8 μ g/mL de metanol.

O cloreto de sódio e a solução de hidróxido de sódio 1M foram lavados duas vezes com o solvente de extração éter di-isopropílico: diclorometano (1:1, v/v).

Os solventes empregados nos procedimentos de extração e como fase móvel dos sistemas cromatográficos (grau cromatografia) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.4.2 Equipamentos

Para análise do metoprolol, O-desmetilmetoprolol, α -hidroximetoprolol e do metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregado um sistema HPLC constituído por cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por bomba modelo LC-10 ADVP com amostrador de 100 μ L, *rack* operando a 5°C, injetor automático modelo SIL 10 AVP e detector por fluorescência modelo RF 10 AXL operando em 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão). Para registrar e integrar os picos dos

cromatogramas foi empregado um integrador modelo CR6A Chromatopac Shimadzu (Kyoto, Japão).

A separação dos enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol foi obtida em coluna Chiralpak[®]AD (Daicel Chemical Industries, New York, EUA), com partículas de 10 μ m (250 x 4,6 mm) protegida por pré-coluna CN (Lichrospher[®]100, 4x4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha), à temperatura de 24°C. A fase móvel foi constituída por mistura de hexano:etanol:isopropanol:dietilamina (88:10,2:1,8:0,2, v/v) na vazão de 1,2 mL/min. Para a separação dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregada uma coluna Chiralcel[®]OD-R (Daicel Chemical Industries, New York, EUA), com partículas de 10 μ m (250 x 4,6 mm) protegida por pré-coluna RP-18 (Nova-Pak[®], Waters), à temperatura de 24°C. A fase móvel empregada para a eluição foi constituída por mistura de tampão perclorato 0,5 M pH=3,0: acetonitrila (85: 15) com fluxo de 0,4 mL/min a 25°C.

3.4.3 Preparo da amostra

3.4.3.1 Metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol

Para a extração líquido-líquido foram utilizadas alíquotas de 1000 μ L de plasma, alcalinizadas com 250 μ L da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M, adicionadas de 100mg de cloreto de sódio, e extraídas com 4 mL da solução diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v) durante 30 min em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min). As amostras foram centrifugadas a 1800 g durante 5 min e as fases orgânicas (3,5 mL) concentradas sob fluxo de ar. Os resíduos foram

retomados em 150 μ L de fase móvel e 100 μ L foram submetidos à análise cromatográfica como esquematizado na Figura 7.

Figura 7. Procedimento de extração líquido-líquido do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma.

3.4.3.2 Ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma de ratos (Cerqueira et al., 2003)

Alíquotas de 400 μ L de plasma foram alcalinizadas com 25 μ L de solução de hidróxido de sódio 1 M e desproteinizadas com 3 mL de acetonitrila. Os tubos foram agitados em *vortex* por 30 segundos. Após centrifugação, 3 mL do sobrenadante

foram transferidos para outros tubos contendo o mesmo volume da mistura diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v). Os tubos foram agitados por mais 1 minuto em *vortex* e centrifugados a 2500g por 5 min. As fases aquosas (100 µL) foram transferidas para os frascos do injetor automático, adicionadas de 15 µL de ácido perclórico 0,225M e submetidas a análise cromatográfica (50 µL), como esquematizado na Figura 8.

Figura 8. Procedimento de extração líquido-líquido do ácido O-desmetilmetoprolóico de plasma.

3.4.4 Curvas de calibração

As curvas de calibração para a análise dos enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol, foram construídas com dados obtidos após análise de alíquotas de 1,0 mL de plasma branco (plasma obtido de

ratos não tratados com metoprolol) enriquecidas com 25 μ L de cada uma das soluções padrão sendo, posteriormente, submetidas aos processos de extração líquido-líquido e análise cromatográfica especificados anteriormente. As curvas de calibração foram construídas no intervalo de 10 a 500 ng de cada enantiômero do metoprolol e do O-desmetilmetoprolol/mL e no intervalo de 5 a 250ng de cada isômero do α -hidroximetoprolol/mL.

Para a curva de calibração do metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico 25 μ L das soluções de uso foram adicionadas a 400 μ L de plasma branco. As concentrações plasmáticas correspondem de 345 a 6900 ng de cada enantiômero/mL.

Para a construção das curvas de calibração, as concentrações foram relacionadas no eixo $\underline{x}$ e as áreas dos picos no eixo $\underline{y}$. Foram determinadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação.

3.5 Análise farmacocinética

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral do metoprolol foram analisados por metodologia compartimental. A área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$) foi determinada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada (6h) e extrapolada até o infinito dividindo-se a última concentração quantificada pela constante velocidade de eliminação (K_{el}).

O *software* WinNolin gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos. (Gabrielson & Weiner, 2000). As estimativas finais incluem a constante velocidade de eliminação (k_{el}), o volume aparente de distribuição (V_d/f), a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e o *clearance* total aparente (Cl_T/f).

3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Instat[®] (GraphPad Software, CA, USA) para obtenção da mediana, média, erro padrão da média e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para a avaliação das razões enantioméricas diferentes da unidade para o metoprolol foram empregados os testes de Wilcoxon e Friedman para dados pareados. A comparação de dados entre os grupos foi analisada com auxílio dos testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis para dados não pareados. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

4 *R*ESULTADOS

4.1 Análise do etilbenzeno na atmosfera da câmara NOES

Na Figura 9 é apresentado um perfil cromatográfico (CG/DIC) obtido com a análise de uma amostra de etilbenzeno em ar.

Figura 9. Cromatograma referente à análise de etilbenzeno em ar por CG/DIC. (1) dissulfeto de carbono, (2) etilbenzeno, (3) isopropilbenzeno (PI).

4.1.1 Curva de calibração

Na Figura 10 está representada a curva de calibração para a determinação de etilbenzeno no ar nas concentrações de 4,4; 8,8; 17,6 e 26,4mg de etilbenzeno, correspondentes respectivamente a 1,6; 3,4; 6,8 e 10 vezes o LEO para um volume de 6L de ar coletado.

Figura 10. Representação da curva de calibração para a análise do etilbenzeno no ar (RA corresponde à razão de áreas padrão/padrão interno).

4.1.2 Determinação do etilbenzeno na câmara de exposição

Os resultados das análises do etilbenzeno na câmara de exposição estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Determinação do etilbenzeno no ar da câmara de exposição.

Concentração teórica (mg/m ³)	Concentração obtida* (mg/m ³)
434	460,20
1736	1669,87

* Média geométrica de 30 coletas por grupo.

4.2 Análise estereosseletiva do metoprolol e seus principais metabólitos em plasma de ratos

4.2.1 Análise Cromatográfica

A análise dos isômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma de ratos foi realizada após extração líquido-líquido. A separação dos enantiômeros do metoprolol e O-desmetilmetoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol foi obtida utilizando a coluna Chiralpak[®] AD protegida por pré-coluna CN com fase móvel hexano:etanol:isopropanol:dietilamina (88:10,2:1,8:0,2) sob o fluxo de 1,2 mL/min. Os cromatogramas apresentados na Figura 11 mostram que os componentes endógenos do plasma de rato não interferem no método analítico.

Figura 11. Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do metoprolol e do O-desmetilmetoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma. (A) Branco; (B) Plasma enriquecido com metoprolol, O-desmetilmetoprolol e α -hidroximetoprolol racêmicos; (C) Amostra de plasma de rato coletada 2h após a administração de 15 mg/kg de metoprolol racêmico.

1 - R-(+)-metoprolol (MET)	5 - 1'S,2R- α -hidroximetoprolol (α -OHM)
2 - S-(-)-metoprolol (MET)	6 - 1'S,2S- α -hidroximetoprolol (α -OHM)
3 - R-(+)-O-desmetilmetoprolol (ODM)	7 - 1'R,2R- α -hidroximetoprolol (α -OHM)
4 - S-(-)-O-desmetilmetoprolol (ODM)	8 - 1'R,2S- α -hidroximetoprolol (α -OHM)

Os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foram separados na coluna Chiralcel[®] OD-R com fase móvel constituída por tampão perclorato 0,5 M pH=3,1:acetonitrila (85:15) após purificação do plasma com solvente orgânico. Como pode ser observado na Figura 12, os componentes endógenos do plasma de rato não interferem no método analítico.

Figura 12. Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma. (A) Branco; (B) Plasma enriquecido com ácido O-desmetilmetoprolóico racêmico; (C) Amostra de plasma de rato coletada 2h após a administração de 15 mg/kg de metoprolol racêmico.

- 1 - R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM)
- 2 - S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM)

4.2.2 Curvas de calibração

As Figuras 13, 14, 15 e 16 mostram as curvas de calibração para a análise dos enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol, ácido O-desmetilmetoprolóico e isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma, respectivamente.

Figura 13. Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-metoprolol e S-(-)-metoprolol em plasma de ratos.

Figura 14. Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-O-desmetilmetoprolol e S-(-)-O-desmetilmetoprolol em plasma de ratos.

Figura 15. Curvas de calibração para a análise dos enantiômeros R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolólico e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma de ratos.

Figura 16. Curvas de calibração para a análise dos isômeros 1'S,2R- α-hidroximetoprolol, 1'S,2S- α-hidroximetoprolol, 1'R,2R-α-hidroximetoprolol e 1'R,2S-α-hidroximetoprolol em plasma de ratos.

4.3 Análise farmacocinética

4.3.1 Grupo controle dose 30mg/kg

A Figura 18 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do metoprolol no grupo de animais controle tratados com 30 mg/kg.

Figura 17. Curvas concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros do metoprolol no grupo controle dose 30mg/kg (n= 6/tempo de colheita). Dados apresentados como mediana.

Tabela 2 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo controle tratado com 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	379,11	319,30*
	422,23(211,59-632,87)	336,90(165,10-508,70)
Cl/f (L/h/kg)	39,91	47,30*
	43,13(21,97-64,28)	55,71(24,96-86,46)
AUC ^{0-∞} _{S-(-)/R-(+)}	1,25	1,26(1,17-1,35)

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

4.3.2 Grupo controle dose 15mg/kg

A Figura 18 e as Tabelas 3, 4, 5 e 6 mostram as curvas concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol, ácido O-desmetilmetoprolol e para os isômeros do α -hidroximetoprolol.

Figura 18. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo controle dose 15mg/kg (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.

- I - enantiômeros do metoprolol
- II - enantiômeros O-desmetilmetoprolol
- III- isômeros do α -hidroximetoprolol
- IV- enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico

Tabela 3 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
$C_{\max}$ (ng/mL)	61,13 62,38(49,70-75,06)	56,05 58,13(48,16-68,09)
$t_{\max}$ (h)	0,37 0,35(0,26-0,44)	0,30 0,31(0,23-0,39)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	95,70 91,64(69,51-113,76)	101,85 99,62(71,53-127,71)
Vd/f (L/kg)	430,02 446,91(348,81-562,76)	396,24 473,70(290,13-943,25)
Cl/f (L/h/kg)	78,37 91,72(53,99-129,46)	73,63 80,45(55,82-105,09)
$t_{1/2\beta}$ (h)	3,23 3,03(2,28-3,79)	4,56 4,28(2,44-6,12)
β (h^{-1})	0,19 0,20(0,11-0,31)	0,2 0,18(0,12-0,25)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$	1,07 1,11(0,77-1,44)	

Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, $p < 0,05$.

Tabela 4 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-O-desmetilmetoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-ODM	S-(-)-ODM
$C_{\max}$ (ng/mL)	24,92 26,07(20,76-32,33)	23,90 25,82(23,31-32,18)
$t_{\max}$ (h)	0,65 0,68(0,51-0,97)	0,65 0,68(0,49-0,95)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	61,57 61,46(41,70-78,73)	58,56 58,98(42,63-72,61)
$t_{1/2\beta}$ (h)	1,14 1,17(0,99-1,42)	1,04 1,05(0,96-1,20)
K_{el} (h ⁻¹)	0,58 0,57(0,48-0,70)	0,59 0,59(0,52-0,71)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$		0,96 0,96(0,92-1,02)

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, $p < 0,05$.

Tabela 5 - Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α -hidroximetoprolol no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
C_{max} (ng/mL)	34,88♦ 34,17 (30,73-36,14)	30,98⊗ 30,68 (21,22-36,87)	344,46 353,93 (296,73-450,65)	421,02 425,1 (360,09-506,76)
t_{max} (h)	0,64 0,62 (0,47-0,74)	0,68 0,68 (0,46-0,97)	0,54 0,53 (0,45-0,58)	0,53 0,55 (0,47-0,68)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	76,62#♦ 78,14 (69,34-90,28)	72,99⊗ 74,18 (62,54-88,12)	629,99 631,44 (572,94-695,64)	728,20 703,46 (508,25-831,72)
$t_{1/2}$ (h)	1,18♦ 1,15 (1,04-1,28)	1,15⊗ 1,18 (0,91-1,70)	0,90 0,87 (0,74-1,00)	0,70 0,72 (0,56-0,92)
Kel (h ⁻¹)	0,57♦ 0,59 (0,53-0,66)	0,59⊗ 0,59 (0,40-0,75)	0,77 0,79 (0,69-0,92)	0,77 0,82 (0,70-0,99)
$AUC^{0-\infty}$ 1'S,2R/ 1'S,2S		0,99 1,06(0,95-1,44)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R,2R / 1'R,2S		0,87 0,91(0,77-1,21)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S		8,72 8,74(8,0-9,96)		
$AUC^{0-\infty}$ 2S/2R		1,12 1,07(0,84-1,21)		

Teste de Friedman, para dados pareados, $p < 0,05$.

1'S,2R *versus* 1'R,2R;

♦ 1'S,2R *versus* 1'R,2S;

⊗ 1'S,2S *versus* 1'R,2S.

Tabela 6 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico no grupo controle tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
$C_{\max}$ (ng/mL)	2944,0 2950,2(2400,0-3330,0)	2825,0 2852,8(2296,0-3462,0)
$t_{\max}$ (h)	1,17 1,15(0,99-1,30)	1,21 1,19(1,04-1,29)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	6812,5 7029,7(6096,0-7892,0)	6787,0 6861,2(5785,0-7901,0)
$t_{1/2}$ (h)	0,97 1,01(0,57-1,50)	0,94 0,98(0,51-1,50)
K_{el} (h^{-1})	0,62 0,64(0,55-0,81)	0,67 0,76(0,50-1,35)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$	0,97 0,97(0,93-1,01)	

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, $p < 0,05$.

4.3.3 Grupo exposto ao etilbenzeno 434 mg/m³ (1 LEO)

A Figura 19 e as Tabelas 7, 8, 9 e 10 mostram as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol, ácido O-desmetilmetoprolol e para os isômeros do α -hidroximetoprolol.

Figura 19. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo exposto ao etilbenzeno 434 mg/m³ (1 LEO), (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.

I - enantiômeros do metoprolol

II – enantiômeros do O-desmetilmetoprolol

III- isômeros do α -hidroximetoprolol

IV- enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico

Tabela 7 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo exposto a 434 mg/m³ (1 LEO) de etilbenzeno e tratado com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
C _{max} (ng/mL)	36,81 39,43(28,15-64,4)	45,63 45,92(41,0-51,79)
t _{max} (h)	0,4 0,38(0,19-0,52)	0,4 0,36(0,16-0,53)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	78,29 80,1(63,27-98,64)	92,1 101,71(87,51-134,77)
Vd/f (L/kg)	664,74 623,48(446,74-790,17)	476,08 482,33(355,69-606,19)
Cl/f (L/h/kg)	191,22 191,24(152,06-237,06)	163,12 151,56(111,29-171,38)
t ½ β (h)	2,45 2,34(1,54-3,08)	2,19 2,21(1,56-2,79)
β (h ⁻¹)	0,24 0,24(0,10-0,44)	0,32 0,32(0,24-0,44)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)	1,16 1,28(1,03-1,91)	

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

Tabela 8 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-O-desmetilmetoprolol no grupo exposto a 434 mg/m³ (1LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-ODM	S-(-)-ODM
C _{max} (ng/mL)	28,75 28,85(21,89-34,23)	27,18 27,73(23,31-32,31)
t _{max} (h)	0,49 0,50(0,34-0,80)	0,72 0,72(0,38-1,02)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	84,59 82,30(67,04-90,28)	72,48 72,59(60,61-85,68)
t ½ β (h)	1,67 1,68(1,49-2,00)	1,22* 1,22(0,93-1,53)
Kel (h ⁻¹)	0,41 0,41(0,34-0,46)	0,55 0,55(0,45-0,73)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)		0,93 0,88(0,67-1,04)

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

Tabela 9 - Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α -hidroximetoprolol no grupo exposto a 434 mg/m³ (1LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
$C_{\max}$ (ng/mL)	32,14♦ 29,26 (16,78-33,63)	35,97⊗ 33,11 (16,34-40,24)	185,41 204,05 (137,24-245,75)	219,79 258,90 (182,99-407,04)
$t_{\max}$ (h)	1,07 0,98 (0,66-1,30)	1,04 1,05 (0,66-1,40)	0,76 0,72 (0,40-1,00)	0,83 0,77 (0,39-0,99)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	68,51♦ 68,25 (44,64-84,27)	73,88⊗ 73,63 (44,25-95,30)	466,52 490,63 (379,08-642,91)	549,79 591,47 (491,98-800,00)
$t_{1/2}$ (h)	0,82 0,87 (0,62-1,34)	0,61 0,74 (0,52-1,39)	1,09 1,01 (0,84-1,44)	1,03 0,93 (0,39-1,21)
K_{el} (h ⁻¹)	0,73 0,76 (0,51-0,98)	0,73 0,70 (0,47-0,81)	0,62 0,63 (0,47-0,81)	0,66 0,69 (0,56-0,82)
$AUC^{0-\infty}$ 1'S,2R / 1'S,2S		0,97 0,93(0,72-1,01)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R,2R / 1'R,2S		0,81 0,82(0,77-0,92)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S		7,19 7,88(5,96-11,57)		
$AUC^{0-\infty}$ 2S/2R		1,20 1,18(1,07-1,25)		

Teste de Friedman, para dados pareados, $p < 0,05$.

♦ 1'S,2R *versus* 1'R,2S;

⊗ 1'S,2S *versus* 1'R,2S.

Tabela 10 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico no grupo exposto a 434 mg/m³ (1LEO) de etilbenzeno e com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
C _{max} (ng/mL)	3055,0 3065,3(2009,0-4067,0)	3599,5* 3426,0(2177,0-4140,0)
t _{max} (h)	1,14 1,18(0,98-1,47)	1,20 1,20(1,10-1,29)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	8250,0 7932,2(6173,0-9353,0)	8028,5 8227,3(7153,0-9596,0)
t _{1/2} (h)	1,08 1,07(0,93-1,18)	1,09 1,09(0,94-1,25)
Kel (h ⁻¹)	0,63 0,64(0,58-0,74)	0,63 0,63(0,55-0,73)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)		1,02 1,04(0,93-1,2)

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

4.3.4 Grupo exposto ao etilbenzeno 1736 mg/m³ (4 LEO)

A Figura 20 e as Tabelas 11, 12, 13 e 14 mostram as curvas de concentração plasmática *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol, ácido O-desmetilmetoprolóico e para os isômeros do α -hidroximetoprolol para os animais expostos ao etilbenzeno 1736 mg/m³.

Figura 20. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do metoprolol e metabólitos para o grupo exposto ao etilbenzeno 1736 mg/m³ (4 LEO), (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.

- I - enantiômeros do metoprolol
- II - enantiômeros O-desmetilmetoprolol
- III- isômeros do α -hidroximetoprolol
- IV- enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico

Tabela 11 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-metoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m³ (4 LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
C _{max} (ng/mL)	33,67 32,43(21,86-41,43)	28,97 28,92(22,82-35,28)
t _{max} (h)	0,45 0,44(0,32-0,53)	0,47 0,47(0,38-0,57)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	67,57 65,16(45,62-75,11)	70,23 72,47(43,71-110,57)
Vd/f (L/kg)	1259,2 1261,6(1000,0-1557,0)	700,22* 668,96(435,76-847,87)
Cl/f (L/h/kg)	224,66 237,85(199,70-328,73)	213,62 223,36(135,66-343,16)
t ½ β (h)	3,33 3,6(3,10-4,40)	1,75* 2,11(1,50-4,09)
β (h ⁻¹)	0,2 0,19(0,15-0,22)	0,39* 0,36(0,16-0,45)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)	1,11 1,11(0,72-1,47)	

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

Tabela 12 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-O-desmetilmetoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m³ (4LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-ODM	S-(-)-ODM
C _{max} (ng/mL)	31,82 32,34(24,37-40,22)	30,58 26,29(19,67-30,58)
t _{max} (h)	0,40 0,48(0,27-0,99)	0,75 0,70(0,23-0,96)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	122,84 122,58(79,00-167,04)	92,33 94,93(70,82-132,44)
t ½ β (h)	2,26 2,46(1,28-4,06)	1,90 2,12(0,91-4,01)
Kel (h ⁻¹)	0,41 0,41(0,34-0,46)	0,55 0,55(0,45-0,73)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)	0,77 0,80(0,51-1,08)	

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

Tabela 13 - Disposição cinética dos isômeros 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S α -hidroximetoprolol no grupo exposto a 1736 mg/m³ (4 LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita,

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
$C_{\max}$ (ng/mL)	21,82♦ 20,48 (11,14-25,71)	19,62⊗ 19,68 (13,57-25,97)	230,48 229,38 (148,64-289,36)	253,83 255,34 (184,46-345,09)
$t_{\max}$ (h)	0,90 0,89 (0,53-1,15)	0,70 0,78 (0,55-1,17)	0,90 0,88 (0,60-1,15)	0,91 0,89 (0,64-1,10)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	53,34♦ 51,49 (28,07-64,79)	44,28♣⊗ 47,22 (41,38-58,85)	565,62 551,62 (446,81-614,64)	573,48 582,15 (489,48-732,72)
$t_{1/2}$ (h)	1,03 0,99 (0,66-1,12)	1,20 1,34 (0,74-2,72)	0,88 0,37 (0,46-1,23)	0,91 0,83 (0,46-0,96)
K_{el} (h ⁻¹)	0,66 0,62 (0,46-0,69)	0,57 0,60 (0,25-0,93)	0,77 0,73 (0,0,56-0,79)	0,74 0,74 (0,71-0,82)
$AUC^{0-\infty}$ 1'S,2R / 1'S,2S		1,04 1,09(0,62-1,49)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R,2R / 1'R,2S		0,98 0,94(0,81-1,01)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S		11,41 11,64(9,58-14,74)		
$AUC^{0-\infty}$ 2S/2R		1,01 1,04(0,97-1,17)		

Teste de Friedman, para dados pareados, $p < 0,05$.

♣ 1'S,2S *versus* 1'R,2R;

♦ 1'S,2R *versus* 1'R,2S;

⊗ 1'S,2S *versus* 1'R,2S.

Tabela 14 - Disposição cinética dos enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico no grupo exposto a 1736mg/m³ (4LEO) de etilbenzeno e tratados com 15mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita.

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
C _{max} (ng/mL)	3047,0 3021,2(2464,0-3626,0)	3270,0 3176,5(2707,0-3488,0)
t _{max} (h)	1,04 1,03(0,70-1,28)	1,12 1,07(0,72-1,22)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	8592,0 8648,2(7796,0-9295,0)	8733,0 8610,7(7316,0-9760,0)
t _{1/2} (h)	1,23 1,28(1,14-1,70)	1,18* 1,23(1,12-1,53)
Kel (h ⁻¹)	0,54 0,54(0,50-0,60)	0,58 0,57(0,50-0,61)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)		0,97 0,98(0,87-1,11)

*Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p< 0,05.

4.3.5 Grupo controle 15mg/kg vs grupo controle 30mg/kg

Na Figura 21 e nas Tabelas 15 e 16 é apresentada as curvas de concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros R-(+) e S(-) metoprolol respectivamente, nos animais tratados com metoprolol racêmico nas doses de 15mg/kg e 30mg/kg.

Figura 21. Curvas concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros R-(+)- S(-) metoprolol nos grupos controle 15mg/kg e 30mg/kg. Dados apresentados como mediana (n= 6/tempo de colheita).

Tabela 15 – Disposição cinética do R-(+)-MET nos grupos controle tratados com 15mg/kg e 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita de cada grupo.

Parâmetro	R-(+)-MET (15mg/kg)	R-(+)- MET (30mg/kg)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	95,70 91,64(69,51-113,76)	379,11* 422,23(211,59-632,87)
Cl/f (L/h/kg ⁻¹)	78,37 91,72(53,99-129,46)	39,91* 43,13(21,97-64,28)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)	1,07 1,11(0,77-1,44)	1,25 1,26(1,17-1,35)

*Teste de Mann-Whitney, p< 0,05.

Tabela 16 - Disposição cinética do S-(-)-MET nos grupos controle tratados com 15mg/kg e 30mg/kg de metoprolol racêmico. Dados apresentados como mediana, média (IC 95%), n=6 para cada tempo de colheita de cada grupo.

Parâmetro	S-(-)-MET (15mg/kg)	S-(-)- MET (30mg/kg)
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	101,85 99,62(71,53-127,71)	319,30* 336,90(165,10-508,70)
Cl/f (L/h/kg)	73,63 80,45(55,82-105,09)	47,30 55,71(24,96-86,46)
AUC ^{0-∞} S-(-)/R-(+)	1,07 1,11(0,77-1,44)	1,25 1,26(1,17-1,35)

*Teste de Mann-Whitney, p< 0,05.

4.3.6 Grupo controle 15mg/kg vs grupos expostos ao etilbenzeno 434mg e 1736mg/m³

Figura 22. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros R-(+)- do metoprolol e metabólitos para os grupos controle e expostos ao etilbenzeno 434 mg/m³ (1 LEO) e 1736 mg/m³ (4 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.

- I – R-(+)-MET
- II – R-(+)-ODM
- III – 1'R2R-OHM
- IV – 1'R2S-OHM
- V – R-(+)-AODM

Figura 23. Curvas concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros S-(-) do metoprolol e metabólitos para os grupos controle e expostos ao etilbenzeno 434 mg/m³ (1 LEO) e 1736 mg/m³ (4 LEO). (n= 6/tempo de colheita). Valores expressos como medianas.

I – R-(+)-MET
 II – R-(+)-ODM
 III – 1'S2R-OHM
 IV – 1'S2S-OHM
 V – R-(+)-AODM

Tabela 17 - Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro AUC^{0-∞} (ng.h/mL).

	AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)		
	Controle	434 mg/m ³ (1 LEO)	1736 mg/m ³ (4LEO)
R-(+)-MET	95,70	78,29	67,57*
S-(-)- MET	101,85	92,10	70,23
R-(+)-ODM	61,57	84,59	122,84*
S-(-)-ODM	58,56	72,48	92,33*
1'S,2R-OHM	76,62	68,51	53,34*
1'S,2S-OHM	72,99	73,88	44,28*♦
1'R,2R-OHM	629,99	466,52*	565,62
1'R,2S-OHM	728,20	549,79	573,48
R-(+)-AODM	6812,5	8250,0	8592,0*
S-(-)-AODM	6787,0	8028,5	8733,0*

Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, p<0,05.

* 434 mg/m³ (1 LEO) ou 1736 mg/m³ (4LEO) *versus* controle

♦ 434 mg/m³ (1 LEO) *versus* 1736 mg/m³ (4LEO)

Tabela 18 - Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro C_{max} (ng/mL).

	C _{max}		
	Controle	434 mg/m ³ (1 LEO)	1736 mg/m ³ (4LEO)
R-(+)-MET	61,13	36,81	33,67*
S-(-)- MET	56,05	45,63	28,97*
R-(+)-ODM	24,92	28,75	31,82
S-(-)-ODM	23,90	27,18	30,58
1'S,2R-OHM	34,88	32,14	21,82*
1'S,2S-OHM	30,98	35,97	19,62♦
1'R,2R-OHM	344,46	185,41*	230,48*
1'R,2S-OHM	421,02	219,79*	253,83*
R-(+)-AODM	2944,0	3055,0	3047,0
S-(-)-AODM	2825,0	3599,5	3270,0

Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, p<0,05.

* 434 mg/m³ (1 LEO) ou 1736 mg/m³ (4LEO) *versus* controle

♦ 434 mg/m³ (1 LEO) *versus* 1736 mg/m³ (4LEO)

Tabela 19 - Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o parâmetro t_{1/2} (h).

	t _{1/2} (h)		
	Controle	434 mg/m ³ (1 LEO)	1736 mg/m ³ (4LEO)
R-(+)-MET	3,23	2,45	3,33♦
S-(-)- MET	4,46	2,19	1,75♦
R-(+)-ODM	1,14	1,67*	2,26*
S-(-)-ODM	1,04	1,22*	1,90*
1'S,2R-OHM	1,18	0,82	1,03
1'S,2S-OHM	1,15	0,61	1,20
1'R,2R-OHM	0,90	1,09	0,88
1'R,2S-OHM	0,70	1,03	0,91
R-(+)-AODM	0,97	1,08	1,23
S-(-)-AODM	0,94	1,09	1,18

Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, p<0,05.

* 434 mg/m³ (1 LEO) ou 1736 mg/m³ (4LEO) *versus* controle

♦ 434 mg/m³ (1 LEO) *versus* 1736 mg/m³ (4LEO)

Tabela 20 - Avaliação da indução enzimática no metabolismo do metoprolol pela exposição ao etilbenzeno. Dados apresentados como mediana (n=6 para cada tempo de colheita) para o Cl/f (L/h/kg).

	Cl/f (L/h/kg)		
	Controle	434 mg/m ³ (1 LEO)	1736 mg/m ³ (4LEO)
R-(+)-MET	78,37	191,22	224,66*
S-(-)- MET	73,63	163,12	213,62*

Teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, p<0,05.

* 1736 mg/m³ (4LEO) *versus* controle

5 *DISCUSSÃO*

O metoprolol é um fármaco cujo metabolismo em ratos depende principalmente do CYP2D e CYP3A (BORALLI, 2006), enzimas que podem ser induzidas ou inibidas, dentre outros fatores por exposição ocupacional a solventes.

A principal via de eliminação do etilbenzeno é através da biotransformação, sendo que a fração eliminada inalterada pelo ar exalado é quantitativamente insignificante (HENDERSON, 2005; ACGIH, 2006).

A biotransformação do etilbenzeno em microsossomos hepáticos humanos mostra a participação de vários CYPs, incluindo CYP2D6 e CYP3A4 (SAMS et al, 2004). Em pesquisas envolvendo indução enzimática, segundo Serron, Dwivedi e Backes (2000), ratos tratados com dose única de etilbenzeno, mostraram aumento nos níveis das proteínas correspondentes aos CYP3A2, CYP2E1 e CYP2B.

Não foram encontrados dados referentes à influência do etilbenzeno na disposição cinética do metoprolol e seus metabólitos em ratos ou em outros animais de experimentação.

Considerando que a exposição ao etilbenzeno provavelmente resulte na indução do metabolismo do metoprolol em ratos, e considerando que em estudo anterior do grupo a dose de 15mg/kg de peso resultou em concentrações plasmáticas dos enantiômeros do fármaco inalterado e metabólitos próximas aos limites de quantificação do método, na presente investigação, foi avaliada a existência de linearidade na farmacocinética do metoprolol administrado na dose de 30mg/kg.

Os animais dos grupos controle 15 e 30mg/kg foram contidos na câmara de exposição, expostos apenas ao ar, durante 6 horas por dia, por um período de cinco dias, tendo sido tratados no quinto dia com dose única oral de tartarato de metoprolol racêmico. Os animais do grupo exposto ao etilbenzeno foram contidos da

mesma forma e expostos a 434 ou 1736mg/m³ de etilbenzeno por cinco dias consecutivos, durante 6 horas por dia, tratados no quinto dia com dose única oral de tartarato de metoprolol racêmico.

A investigação da enantiosseletividade na disposição cinética de fármacos usados na terapêutica exige a disponibilidade de métodos analíticos com capacidade de discriminação quiral e com limites de confiança compatíveis com as baixas concentrações plasmáticas dos enantiômeros. A separação dos enantiômeros do metoprolol, O-desmetilmetoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma de ratos foi realizada segundo Boralli et al. (2005) e para os enantiômeros do metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico segundo o método de Cerqueira et al. (2003).

O metoprolol racêmico foi administrado aos animais por gavagem, no entanto, a biodisponibilidade dos enantiômeros individuais não é conhecida exigindo o cálculo do *clearance* e do volume de distribuição como parâmetros aparentes (Cl/f e Vd/f).

A disposição cinética do metoprolol em ratos não é enantiosseletiva no grupo controle 15mg/kg, para os parâmetros AUC, t_{max} , Vd/f, Cl/f, $t_{1/2}$ e C_{max} . Os parâmetros estão de acordo com os dados relatados por Boralli et al. (2005), que investigou a farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol e seus metabólitos em ratos tratados com 15mg/kg.

Mostafavi e Foster (2000) investigaram a enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol administrado por via oral em dose única de 20mg/kg em ratos mostrando maiores valores de Cl/f para o enantiômero S-(-)-MET (135,6 vs 119,4 L/h/kg).

Os valores de *clearance* aparente apresentados na Tabela 3 referentes ao grupo controle 15mg/kg, 78,37 e 73,63 L/h/kg, respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-MET, estão de acordo com os dados apresentados por Boralli et al., (2005) (76,03 vs 90,15 L/h/kg).

Com relação aos metabólitos O-desmetilmetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico avaliados nos ratos do grupo controle, não houve enantiosseletividade nos parâmetros farmacocinéticos estudados (Tabelas 4 e 6). No entanto, para o metabólito α -hidroximetoprolol houve predominância ($p < 0,05$) na formação dos isômeros 1'R em relação aos isômeros 1'S ($AUC^{0-\infty} 1'R/1'S = 8,72$; Tabela 5). Murthy et al. (1990) relatam que em microsossomos de fígado de rato a reação de hidroxilação é predominante para os isômeros 1'R em relação aos isômeros 1'S com observação de razões $1'R/1'S > 12$. Os dados obtidos na investigação da enantiosseletividade no metabolismo do metoprolol também estão de acordo com os dados relatados por Boralli et al. (2005), apesar dos animais no presente estudo estarem contidos em câmara de exposição, sem acesso a água e ração, durante a exposição diária (6h) e, portanto, submetidos a uma condição de estresse. Ressalta-se, no entanto, que durante os experimentos não houve perda de nenhum animal e não foi observada qualquer indicação de estresse excessivo dos animais.

Animais com atividade noturna, como ratos, possuem maiores níveis basais de corticosteróides no período da noite, ao contrário de seres humanos (ALLEN-ROWLANDS et al., 1980). Experimentos como este, em que os animais permanecem contidos por um período de tempo e por dias repetidos, chamado também de estresse previsível, mostram aumento diurno dos níveis de corticosteróide no plasma (RENATA-MÁRQUEZ et al., 2002; MARIN; CRUZ;

PLANETA, 2007). O aumento do nível basal de corticosteróides observados em ratos, reflete-se na alteração de glicocorticóides circulantes (MIZOGUCHI et al. 2001), e considerando que a requisição de energia, ingestão de ração e muitos processos metabólicos são mediados por glicocorticóides (MARTÍ, O; MARTÍ, S; ARMARIO, 1994), a exposição ao estresse é considerada responsável por modificação no peso corporal e alteração na fisiologia de diferentes órgãos (MARTÍ, O; MARTÍ, S; ARMARIO, 1994; DOMÍNGUES-GERPE; REY-MÉNDEZ, 1997).

A disposição cinética do metoprolol para os animais do grupo controle 30mg/kg (Tabelas 15 e 16), ao contrário do observado nos animais do grupo controle 15mg/kg, mostra diferenças significativas entre os enantiômeros, para quase todos os parâmetros farmacocinéticos, com observação de menores valores de $AUC^{0-\infty}$ (319,30 vs 379,11 ng.h/mL) e maiores valores de *clearance* aparente (47,30 vs 39,91 L/h/kg) para o enantiômero S-(-)-MET.

A comparação dos *clearances* aparente entre as doses de metoprolol 15 e 30 mg/kg sugere saturação na eliminação de ambos os enantiômeros R-(+)- (78,37 vs 39,21 L/h/kg) e S-(-)-MET (73,63 vs 47,3 L/h/kg). Os fármacos que apresentam cinética linear mostram proporção direta nos valores de $AUC^{0-\infty}$, e os que apresentam cinética não linear exibem um comportamento de parábola com o $AUC^{0-\infty}$ proporcionalmente maior em relação ao aumento da dose. Os dados permitem inferir que o metoprolol utilizado na dose 30mg/kg mostra cinética não linear. A redução do *clearance* aparente sugere acúmulo plasmático do fármaco, causado por saturação enzimática (Figuras 18 e 19).

Os dados ainda mostram que a estereosseletividade na farmacocinética do metoprolol é dependente da dose com acúmulo plasmático preferencial do

enantiômero R-(+)-MET (aproximadamente 4 vezes) quando comparado ao S-(-)-MET (aproximadamente 3 vezes) na dose 30mg/kg.

Considerando que a farmacocinética do metoprolol não é linear na dose 30mg/kg, os experimentos do presente estudo foram conduzidos com a dose de 15mg/kg para os grupos expostos ao etilbenzeno.

Os animais do grupo etilbenzeno foram expostos a duas diferentes concentrações do vapor do solvente equivalentes a 1 e 4 vezes o TLV-TWA (434mg/m³ e 1736mg/m³), escolhidas justamente em função do limite de exposição ocupacional proposto para o ser humano no ambiente de trabalho. Os ensaios para as exposições ao etilbenzeno mostraram que as concentrações reais na câmara, assim como suas flutuações ao longo do tempo, permitem simulação adequada de exposições ao solvente nas concentrações experimentadas (Tabela 1).

A disposição cinética do metoprolol inalterado para os animais do grupo etilbenzeno expostos a 434mg/m³ (1 LEO), à semelhança do grupo controle, não foi enantiosseletiva para nenhum dos parâmetros farmacocinéticos analisados (Tabela 7). Em relação aos metabólitos, a enantiosseletividade foi observada apenas na meia-vida de eliminação do O-desmetilmetoprolol (1,67 vs 1,22h respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-ODM; Tabela 8) e na concentração plasmática máxima do ácido O-desmetilmetoprolóico (3055,0 vs 3599,5 ng/mL respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)-AODM; Tabela 10). A enantiosseletividade na formação do metabólito α -hidroximetoprolol persiste no grupo etilbenzeno exposto a 434mg/m³ (1 LEO) quando comparado ao grupo controle com evidência de acúmulo plasmático dos isômeros 1'R em relação aos isômeros 1'S (AUC 1'R/1'S=7,19 no grupo exposto e 8,72 no grupo controle; Tabelas 5 e 9).

A disposição cinética do metoprolol para os animais do grupo etilbenzeno expostos a 1736mg/m³ (4 LEO), apresentou enantiosseletividade (Tabela 11) para os parâmetros Vd/f e t_{1/2}, com observação de menores valores de Vd/f (700,22 vs 1259,2) e t_{1/2} (1,75 vs 3,33) para o enantiômero S-(-)-MET. Considerando que a t_{1/2} é um parâmetro dependente do *clearance* e do Vd/f e considerando a ausência de enantiosseletividade no *clearance* do metoprolol, a redução nos valores de t_{1/2} para o enantiômero S-(-)-MET pode estar relacionada a diferenças entre os enantiômeros na porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, com provável menor porcentagem de ligação para o enantiômero S-(-)-MET nos animais do grupo etilbenzeno expostos a 1736mg/m³. O metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico apresentou enantiosseletividade apenas para o parâmetro t_{1/2}, com menor valor para S-(-)-AODM (1,23 vs 1,18h Tabela 14). A disposição cinética do metabólito O-desmetilmetoprolol não apresentou enantiosseletividade nos animais do grupo etilbenzeno expostos a 1736mg/m³. Já com relação ao metabólito α -hidroximetoprolol, a enantiosseletividade ocorre apenas para os parâmetros AUC^{0-∞} e C_{max}, com evidência de acúmulo plasmático dos isômeros 1'R em relação aos isômeros 1'S (AUC 1'R/1'S=11,41; Tabela 13).

A comparação estatística (p<0,05) da disposição cinética do metoprolol dos animais do grupo etilbenzeno expostos a 1736mg/m³ (4 LEO) com relação ao grupo controle, apresentou diminuição de 1,41 vezes nos valores de AUC^{0-∞} para o enantiômero R-(+)-MET (67,57 vs 95,70 Tabela 17), com consequente aumento do *clearance* de 2,86 e 2,90 vezes respectivamente para os enantiômeros R-(+)- (224,66 vs 78,37 L/h/kg) e S-(-)-MET (213,62 vs 73,63 L/h/kg; Tabela 20). O aumento do *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol no grupo de animais expostos ao etilbenzeno 1736mg/m³ pode ser explicado em função da indução nas

vias de formação de ambos os enantiômeros dos metabólitos O-desmetilmetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico. Os valores de $AUC^{0-\infty}$ dos enantiômeros do O-desmetilmetoprolol sofreram um aumento de 2,0 e 1,57 vezes para R-(+)-ODM (61,57 vs 122,84) e S-(-)-ODM (58,56 vs 92,33) e os valores de $AUC^{0-\infty}$ dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico de 0,79 e 0,77 vezes para R-(+)-AODM (6812,5 vs 8592,0) e S-(-)-AODM (6787,0 vs 8733,0) (Tabela 17).

Considerando que o CYP3A participa na via de formação do O-desmetilmetoprolol com subsequente formação do metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico (BORALLI, 2006), os dados do presente estudo permitem sugerir que a exposição dos animais ao etilbenzeno na concentração 1736 mg/m³ (4 LEO) durante 5 dias, 6h/dia, induz o CYP3A com conseqüente aumento do *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol. Yuan et al. (1997) relatam que o tratamento de ratos durante 1 a 3 dias com etilbenzeno intraperitoneal na dose de 10 mmol/kg resulta em indução do CYP1A1, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1 e CYP3A1/2. Serron, Dwivedi e Backes (2000) também reportam que ratos tratados com dose única de etilbenzeno intraperitoneal na dose de 10 mmol/kg mostram indução na expressão do CYP3A2 em 67% e do CYP2E1 em 80%.

Em relação aos isômeros do α -hidroximetoprolol, os animais do grupo etilbenzeno expostos a 1736mg/m³ (4 LEO) mostram valores significativamente menores de $AUC^{0-\infty}$ para o par de isômeros 1'S, com observação de redução em 1,43 e 1,64 vezes respectivamente para 1'S,2R e 1S',2S. Por outro lado, observa-se que o par de isômeros 1'R não foi alterado pela exposição ao etilbenzeno (Tabela 17). A redução na formação dos isômeros 1'S pode ser explicada em função de uma possível redução na atividade do CYP2D e/ou da provável maior afinidade do substrato pela via induzida CYP3A. Serron , Dwivedi e Backes (2000) também

reportam que ratos tratados com dose única de etilbenzeno intraperitoneal na dose de 10 mmol/kg mostram redução na expressão do CYP2C11, ou seja, a exposição ao etilbenzeno também pode resultar em inibição da atividade de algumas isoformas do CYP.

Em resumo, os dados permitem inferir que ratos expostos durante 5 dias, 6h/dia, ao etilbenzeno na concentração de 4 vezes o LEO, mostram indução de maneira não enantiosseletiva do metabolismo de ambos os isômeros do metoprolol.

6 *CONCLUSÕES*

1- O metoprolol administrado a ratos sob forma racêmica na dose de 30mg/kg (gavagem) exibe farmacocinética não linear, com acúmulo plasmático do enantiômero R-(+)-metoprolol.

2- A farmacocinética do metoprolol administrado a ratos sob forma racêmica na dose de 15mg/kg (gavagem) é linear e não enantiosseletiva.

3- A exposição ao etilbenzeno inalado em câmara de exposição NOES na concentração de 434mg/m³ (1 LEO), durante 5 dias, 6h/dia, não altera a farmacocinética de ambos os enantiômeros do metoprolol.

4- A exposição ao etilbenzeno inalado em câmara de exposição NOES na concentração de 1736mg/m³ (4 LEO), durante 5 dias, 6h/dia, aumenta o *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol em aproximadamente 3 vezes.

5- O aumento do *clearance* de ambos os enantiômeros do metoprolol no grupo de animais expostos ao etilbenzeno inalado em câmara de exposição NOES na concentração de 1736mg/m³ (4 LEO) pode ser explicado pelo aumento na formação de ambos os enantiômeros dos metabólitos O-desmetilmetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico.

***R*EFERÊNCIAS *B*IBLIOGRÁFICAS**

ALLEN-ROWLANDS, C. F., ALLEN, J. P., GREER, M. A., WILSON, M. Circadian rhythmicity of ACTH and corticosterone in the rat. **J Endocrinol Invest.** V. 3, p. 371-377.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Documentation of the TLVs® and BEIs® with other worldwide occupational exposure values.** Cincinnati, OH, 2006. 1 CD-ROM.

BORALLI, V. B. Farmacocinética-Farmacodinâmica e estereosseletividade no metabolismo do metoprolol: estudo experimental e investigação de voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes melito. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.

BORALLI, V. B., COELHO, E. B., CERQUEIRA, P. M., LANCHOTE, V. L. Stereospecific analysis of metoprolol and its metabolites in rat plasma with application to oxidative metabolism. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 823, p. 195-202, 2005.

BORG, K.O.; CARLSSON, E.; HOFFMANN, K.J.; JOHNSON, T.E.; THORIN, H.; WALLIN, B. Metabolism of metoprolol-(H³) in man, the dog and rat. **Acta. Pharmacol. Toxicol.**, v.36, (Supl V), p.125-35, 1975.

BROCKS, D. R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm. Drug Dispos**, Edmonton, v. 27, p. 387-406, 2006.

BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide and acetonitrile *in vitro* activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. **Drug Metab Dispos**, v.27, n. 2, p. 246-249, 1999.

CERQUEIRA, P. M, BORALLI, V. B.; COELHO, E. B.; LOPES, N. P.; GUIMARÃES, L. F. L.; BONATO, P. S.; LANCHOTE, V. L. Enantiospecific determination of metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: application to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.783, p. 433-41, 2003.

DOMÍNGUES-GERPE, L., REY-MÉNDEZ, M. Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure. **Life Sci.** v. 61, p. 1019-27, 1997.

FARIAS, M. T. Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do lercanodipino em ratos. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2007.

FOSTER C.D.; MACDONALD, I.A. The assay of catecholamine content of small volumes of human plasma. **Biom. Chromatogr.**, London, v.13, p. 209-15, 1999.

HENDERSON, R.F. Aromatic Hydrocarbons—Benzene and Other Alkylbenzenes. In: HARRIS, R. et al. (Ed.). **Patty's industrial hygiene and toxicology**. 5th. ed. New York: Wiley-Interscience, 2005. 1 CD-ROM.

HOLÄNDER, W. Exposure facilities and aerosol generation and characterization for inhalation experiments. In Mohr, U. (ed.). **Inhalation Toxicology**. New York, Springer-Verlag, 1988, p. 67-85.

HUTZLER, J. M.; TRACY, T. S. Atypical kinetic profile in drug metabolism reactions. **Drug Metab Dispos**, v. 30, n. 4, p. 355-362, 2002.

INGELMAN-SUNDERBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P-450 drug metabolism for drug development. **Drug Metab Dispos**, v.29, n. 4, p. 570-573, 2001.

KARIN, A. Enantioselective assays in comparative bioavailability studies of racemic drugs formulation: nice to know or need to know? **J Clin Pharmacol**, v. 36, n. 6, p. 490-499, 1996.

KENNEDY JR. G. L; VALENTINE, R. Inhalation Toxicology. In. Hayes, A. W. (ed). **Principles and Methods of Toxicology**, 3rd ed. New York, Raven Press, 1994, p. 805-838.

KROEMER, H. K.; FROMM, M. F.; EINCHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action effects of enzyme inhibition and induction. **Ther Drug Monit**, v. 18, p. 388-392, 1996.

LARSSON ,M.; LANDAHL, S., LUNDBORG, P.;REGARD, C.G. Pharmacokinetics of metoprolol in healthy, elderly, non-smoking individuals after a single dose and two weeks of treatment. **Eur. J. Clinical Pharmacol.**, Berlin, v. 27, p. 217-22, 1984.

LAURENT-KENESI, M.A.; BRENTANO, C.F.; POIRIER, J.M.; DECOLIN, D.; JAILLON, P. Influence of CYP2D6-dependent metabolism on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol and nicardipene, alone and in combination. **Br J. Clin. Pharmacol**, London, v.36, 531-8, 1993.

LEEMANN, T.D, DEVI, K.P, DAYER P. Similar effect of oxidation deficiency (debrisoquine polymorphism) and quinidine on the apparent volume of distribution of (±)-metoprolol. **Eur J Clin Pharmacol**. v 45, p.65-71, 1993.

LENNARD, M. S.; TUCKER, G. T., WOODS, H.F. The polymorphic oxidation of β -adrenoceptor antagonists. Clinical pharmacokinetic consideration. **Clin. Pharmacokinet**. New York, v.11, p. 1-17, 1986.

LEPERA, J. S., COLACIOPPO, S. Rapid determination of desorption efficiency and analysis of solvent mixtures for occupational exposure studies. **Chromatographia**, v. 55, p. 463-66, 2002.

LEPERA, J. S., COLACIOPPO, S. Occupational exposure to paint solvents and particulate material in car repair shops. **Rev. Bras. Toxicol.** v 18, p 49-55, 2005

LI, F., COOPER, S. F., CÔTÉ, M. Determination of enantiomers of metoprolol and its major acidic metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.668, p. 67-75, 1995.

MARIN, M. T., CRUZ, F. C, PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiol. Behav.** V. 90, p. 29-35, 2007.

MARTÍ, O., MARTÍ, J., ARMARIO, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiol. Behav.** V. 55, p. 747-53, 1994.

MEHVAR, R.; REYNOLDS, J.; Reversal of stereoselectivity in the hepatic availability of verapamil in isolated perfused rat livers. **Drug Metab Dispos**, v. 24, n. 10, p. 1089 – 1094, 1996.

MISTRY, B.; LESLIE, J.; EDDINGTON, N.E. Enantiomeric separation of metoprolol and α -hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 758, p. 153-61, 2001.

MIZOGUCHI, K., YUZURIHARA, M., ISHIGE, A., SASAKI, H., CHUI, D., TABIRA, T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. **Psychoneuroendocrinology**. v. 26, p. 443-59, 2001.

MOSTAFAVI, A.S, FOSTER, R.T. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers following single and multiple administration of racemate in rat. **Int. J. Pharmaceut.** Amsterdam, v. 202, p. 97-102, 2000.

MURTHY, S.S., SHETTY, H.U., NELSON, W.L. JACKSON, P.R., LENARD, M.S. Enantioselective and diastereoselective aspects of metabolism of metoprolol. **Biochem. Pharmacol.** New York, v.40, p. 1637-44, 1990

NAKAJIMA, T; AOYAMA, T. Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in relation to individual susceptibility to industrial chemicals. **Industrial Health**. v.38, p. 143-152, 2000.

NIOSH Manual of Analytical Methods(NMAM). Hydrocarbons, aromatic Method 1501. 4th ed. (3), 2003. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/niosh/nmam/>>. Acesso em: 20/12/2008.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C. D., ed. **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 6.ed. New York:

McGraw-Hill, 2001. p.133-224.

RAPPAPORT, S. Interpreting Levels of Exposures To Chemical Agents. In: HARRIS, R. et al. (Ed.). **Patty's industrial hygiene and toxicology**. 5th. ed. New York: Wiley-Interscience, 2005. 1 CD-ROM.

REGARDH, C.G., JOHNSON, G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol. **Clin. Pharmacokinet.** New York, v.5, p. 557-69, 1980.

RENATA-MÁRQUEZ, S., BONILLA-JAIME, H., VÁZQUEZ-PALACIOS, E., DOMÍNGUEZ-SALAZAR, R., MARTÍNEZ-GARCIA, J., VELÁZQUEZ-MOCTEZUMA. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rat. **Psychoneuroendocrinology**. v28, p. 207-227, 2003.

SAMS A, C., LOIZOU, G D., COCKER, J, LENNARD, M S. Metabolism of ethylbenzene by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). **Toxicol Letters**, v.147, p. 253–260, 2004.

SERRON, S.C., DWIVEDI, N., BACKES, W. L. Ethylbenzene Induces Microsomal Oxygen Free Radical Generation: Antibody-Directed Characterization of the responsible Cytochrome P450 Enzymes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** Amsterdam, v. 164, p. 305–311, 2000.

SIMONYI M, GAL J, TESTA B. Sings of the times: the need for a stereochemical informative generic name sytem. **Trends Pharmacol Sci**, v. 10, p. 349-354, 1989.

SPAHN, H., WELLSTEIN, A., PFLUGMAN, G., MUTSCHLER, E., PALM, D. Radioreceptor assay of metoprolol in human plasma: comparison with a enantiospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) procedure. **Pharm. Research**, New York, v. 6, p. 152-5, 1989.

TUCKER, G., T.; LENNARD, M.S.. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmac Ther**, v.45, p. 309-329, 1990.

UNITED STATES. National Library of Medicine. **Toxicology Literature Online (Toxline)**. Bethesda, 2008. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/chemidplusfs.html>>. Acesso em: 16/07/2008.

YUAN, W., CAWLEY, GF, EVER, CS, BACKES, WL. Induction of P450 3A by ethylbenzene without altering RNA levels. **Biochem. Bioph. Res. Comun.** v. 202: p. 1259-65, 1994.

YUAN, W, SERRON, S C., HADDICAN, M M., CAWLEY, G F., EVER, C S, BACKES, W L. Ethylbenzene modulates the expression of different cytochrome P-450 isozymes by discrete multistep processes. **Bioch Bioph Acta**, v.1334: p.361–372, 1997.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **J. Cell. Mol. Med.**, Bucharest, v. 6, n. 2, p.189-198, 2002.