UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros

Francinalva Dantas de Medeiros

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientadora:
Profa Dra Valentina Porta

São Paulo, 2013

Francinalva Dantas de Medeiros

Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros

Comissão Julgadora da
Tese para a obtenção do grau de Doutor

_____
Profa Dra Valentina Porta

_____
Profa Dra Jacqueline de Souza

_____
Profa Dra Samanta Cardozo Mourão

_____
Prof Dr José Eduardo Gonçalves

_____
Prof Dr José Carlos Saraiva Gonçalves

São Paulo, 2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Medeiros, Francinalva Dantas de
M488i Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros / Francinalva Dantas de Medeiros. -- São Paulo, 2012.
143p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Porta, Valentina

1. Farmacocinética 2. Metoprolol : Farmacocinética 3. Cromatografia líquida de alta eficiência : Química analítica I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

615.7f CDD

"Tenho duas armas para lutar contra o desespero, a tristeza e até a morte: o riso a cavalo e o galope do sonho. É com isso que enfrento essa dura e fascinante tarefa de viver."

Ariano Suassuna

Agradecimentos

À Profa. Dra. Valentina Porta, pela orientação e apoio neste trabalho;

À banca examinadora, pelas contribuições e tempo dedicado à avaliação do trabalho;

À Capes pela concessão da bolsa;

À FAPESP pelo financiamento do projeto;

À Coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos;

Ao Hospital Universitário, pela disponibilização da área para realização do estudo clínico, e aos funcionários envolvidos;

Aos coletores Alessandro e Vanessa, pelo carinho e dedicação;

Aos vonluntários pela disponibilidade e carinho;

Aos colegas do antigo Biofar, Eunice Kano, Eunice Emiko, Simone, Val e Eremita, pelos ensinamentos e pela amizade;

À aluna de iniciação cientifíca Nathalia por toda ajuda e amizade;

Aos amigos amigos do LPB, Marina, Caio, Michelle, Rafael Paraíso, Rafael Melo, Mônica, João, Juliana Barbosa, pela grande ajuda e amizade;

À Michele Issa, pela ajuda com a análise estatística;

Aos colegas de trabalho e melhores amigos que uma pessoa poderia desejar, José Eduardo, Guilherme, Marc, Marina, Rafael Paraíso, Rafael Melo, Mariane, Michelle, Karin, por todo amor e companheirismo;

Aos almoços inesquecíveis com José Eduardo, Guilherme e Marc;
Às amadas amigas sempre presentes na minha vida, Izabelle, Sâmia, e Tássia, por todas as gargalhadas, lágrimas e amor dedicado;

Aos amigos, Vanessa, Daniel, Rafael, Bruno, Wallace, Geraldo, Aline, Torres, pelo incentivo;

A Linus, pela fofura;

Aos sempre companheiros, Deusia, Elthon, Lidiane, Carol, Fernanda, Diogo, Milena, e a todos os demais amigos que sempre estiveram presentes na minha vida, com compreensão e me dando grandes alegrias;

Aos meus professores e amigos da UFPB;

Ao meu orientador do mestrado Prof. Dr. Eduardo, por todas as orientações e amizade;

À minha irmã Neneide, e meus sobrinhos Renathinho e Rogerinho pelo carinho;

Aos meus amados pais Francisca e José Calixto, pela confiança, compreensão pela ausência e amor dedicado;

A Deus, pela luz e pela sombra.

Sumário

	Página
Lista de figuras	I
Lista de quadros	IV
Lista de tabelas	V
Lista de abreviaturas	XII
Resumo	XIV
Abstract	XV
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	5
2.1 Ensaios de bioequivalência para medicamentos contendo fármacos racêmicos	5
2.2 Metoprolol	12
2.3 Métodos enantioméricos de quantificação de fármacos	18
3. Objetivos	23
3.1 Objetivos específicos	23
4. Materiais e Métodos	25
4.1 Materiais	26
4.1.1 Substância química padronizada	26
4.1.2 Medicamento	26
4.1.3 Reagentes e solventes	25
4.1.4 Equipamentos	27
4.1.5 Materiais	27

4.2 Métodos 29

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de (R,S) metoprolol em plasma humano 29

4.2.1.1 Preparo da solução estoque padrão e soluções de trabalho padrão de metoprolol 30

4.2.1.2 Preparo de amostras de plasma padrão da curva de calibração 31

4.2.1.3 Preparo das soluções de trabalho padrão de controle de qualidade 32

4.2.1.4 Preparo de amostras de plasma de controle de qualidade 33

4.2.1.5 Tratamento das amostras de plasma para quantificação de metoprolol 33

4.2.1.6 Condições cromatográficas para quantificação (R,S)-metoprolol em plasma humano 34

4.2.1.7 Validação do método para quantificação de (R,S)-metoprolol em plasma humano 35

4.2.1.7.1 Especificidade 35

4.2.1.7.2 Recuperação 35

4.2.1.7.3 Limite de Quantificação 36

4.2.1.7.4 Linearidade 36

4.2.1.7.5 Precisão 37

4.2.1.7.6 Exatidão 37

4.2.1.7.7 Estabilidade 38

4.2.1.7.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento 39

4.2.1.7.7.2 Estabilidade de curta duração 39

4.2.1.7.7.3 Estabilidade pós-processamento 40

4.2.1.7.7.4 Estabilidade das soluções padrão de trabalho 40

4.2.1.8 Quantificação de (R,S)-metoprolol nas amostras de plasma humano 40

4.2.2 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico quiral para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano 42

4.2.2.1 Preparo das soluções estoque padrão e soluções de trabalho padrão dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 43

4.2.2.2 Preparo de amostras de plasma padrão da curva de calibração dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 44

4.2.2.3 Tratamento das amostras de plasma para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 45

4.2.2.4 Condições cromatográficas para quantificação dos enatiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano 45

4.2.2.5 Validação do método enantioseletivo para quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma 45

4.2.2.6 Quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol nas amostras de plasma dos voluntários 46

4.2.3 Ensaios de Biodisponibilidade 46

4.2.3.1 Administração do medicamento 47

4.2.3.2 Casuística 47

4.2.3.3 Procedimento do ensaio de biodisponibilidade 49

4.2.3.3.1 Delineamento do estudo 49

4.2.3.3.2 Local, forma de internação dos voluntários e alimentação 50

4.2.3.3.3 Coleta, processamento e armazenamento das amostras 51

4.2.4.5 Avaliação da Biodisponibilidade 51

4.2.4.6 Analise estatística 53

5. Resultados 54

5.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de (R,S)-metoprolol em plasma humano 55

5.1.1 Especificidade 55

5.1.2 Recuperação 56

5.1.3 Limite de Quantificação 57

5.1.4 Linearidade 57

5.1.5 Precisão 58

5.1.6 Exatidão 59

5.1.7 Estabilidade 59

5.1.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento 60

5.1.7.2 Estabilidade de curta duração 62

5.1.7.3 Estabilidade pós-processamento 62

5.1.7.4 Estabilidade das soluções padrão 63

5.2 Quantificação de (R,S)-metoprolol em amostras de plasma humano 63

5.2.1 Concentrações plasmáticas médias de (R,S)-metoprolol 64

5.2.2 Curvas médias de decaimento plasmático *versus* tempo para (R,S)-metoprolol 66

5.2.3 Parâmetros farmacocinéticos para o (R,S)-metoprolol 68

5.2.3 Parâmetros farmacocinéticos para o (R,S)-metoprolol 68

5.3 Desenvolvimento e validação de método quiral para quantificação 72

de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano

5.3.1 Especificidade 72

5.3.2 Recuperação 73

5.3.3 Limite de Quantificação 74

5.3.4 Linearidade 75

5.3.5 Precisão 76

5.3.6 Exatidão 78

5.3.7 Estabilidade 79

5.3.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento 79

5.3.7.2 Estabilidade de curta duração 83

5.3.7.3 Estabilidade pós-processamento 84

5.3.7.4 Estabilidade das soluções padrão 86

5.4 Quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em amostras de plasma humano 86

5.4.1 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 86

5.4.2 Curvas médias de decaimento plasmático *versus* tempo para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 92

5.4.3 Parâmetros farmacocinéticos para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol 96

5.5 Análise comparativa dos parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros 103

5.6 Análise estatística 105

6. Discussão 117

7. Conclusões 129

8. Referências bibliográficas 132

Anexos 139

Lista de Figuras

Página

Figura 1 Algoritmo de decisão para avaliação da necessidade de emprego ou não de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos em ensaios de bioequivalência. 8

Figura 2 Estrutura do fármaco metoprolol e seus enantiômeros. 13

Figura 3 Cromatograma referente a amostra de plasma branco. 55

Figura 4 Cromatograma referente a amostra de plasma fortificada com os padrões de metoprolol (8 min) e ofloxacino (4 min). 56

Figura.5 Curva de calibração do metoprolol total em plasma na faixa de concentração de 5 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$. Cada valor representa uma média de seis determinações. 57

Figura 6 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. 67

Figura 7 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 67

Figura 8 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 68

Figura 9: Cromatograma referente a amostra de plasma branco, obtida por método quiral. 72

Figura 10 Cromatograma referente a separação quiral, mostrando (R)-metoprolol em 6,0 minutos e (S)-metoprolol em 8,0 minutos. 73

Figura.11 Curva de calibração para o (R)-metoprolol em plasma na faixa de concentração de 10 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$. Cada valor representa uma média de seis determinações. 75

Figura.12 Curva de calibração para o (S)-metoprolol em plasma na 76

faixa de concentração de 10 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$. Cada valor representa uma média de seis determinações.

Figura 13 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. 93

Figura 14 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. 93

Figura 15 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 94

Figura 16 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 94

Figura 17 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 95

Figura 18 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 95

Figura 19 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S) metoprolol e seus enantiômeros na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. 103

Figura 20 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S) metoprolol e seus enantiômeros na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. 104

Figura 21 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S) metoprolol e seus enantiômeros na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 104

voluntários sadios.

Figura 22 Gráfico de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para (R,S) metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95. 108

Figura 23 Gráfico de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para (R)-metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95. 110

Figura 24 Gráfico de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para (S)-metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95. 112

Figura 25 Gráfico de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), com intervalo de confiança de 0,95. 114

Figura 26 Gráfico de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (R,S/S), com intervalo de confiança de 0,95. 116

Lista de Quadros

	Página
Quadro 1: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do metoprolol após a administração do racemato.	16
Quadro 2: Preparo das soluções de trabalho padrão de metoprolol.	31
Quadro 3: Preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração	32
Quadro 4: Preparo das soluções de trabalho padrão de metoprolol.	32
Quadro 5: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade	33
Quadro 6: Preparo das soluções de trabalho padrão de (R)-metoprolol e S metoprolol.	43
Quadro 7: Preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.	44
Quadro 8 Características dos voluntários que concluíram a etapa clínica para o estudo clínico	49

Lista de Tabelas

Página

Tabela.1 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações 56

Tabela 2 Parâmetros relativos a curva de calibração do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 5 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$. 58

Tabela 3 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias. 58

Tabela 4 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias. 59

Tabela 5 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações. 60

Tabela 6 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações. 61

Tabela 7 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações 61

Tabela 8 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações. 62

Tabela 9 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações. 63

Tabela 10 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 64

Tabela 11 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 65

Tabela 12 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 66

Tabela 13 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 69

Tabela 14 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 70

Tabela 15 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 71

Tabela.16 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para o enantiômero (R)-metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações 74

Tabela.17 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para o enantiômero (S)-metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações. 74

Tabela 18 Parâmetros relativos a curva de calibração do método 75

bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 10 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}.

Tabela 19 Parâmetros relativos a curva de calibração do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 10 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}. 76

Tabela 20 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias. 77

Tabela 21 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias. 77

Tabela 22 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias. 78

Tabela 23 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias. 79

Tabela 24 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações. 80

Tabela 25 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações. 80

Tabela 26 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de 81

congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações.

Tabela 27 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações. 81

Tabela 28 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações. 82

Tabela 29 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações. 82

Tabela 30 Estabilidade do (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações. 83

Tabela 31 Estabilidade do (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações. 84

Tabela 32 Estabilidade do (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações 85

Tabela 33 Estabilidade do (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações. 85

Tabela 34 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = 87

coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Tabela 35 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 88

Tabela 36 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 89

Tabela 37 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 90

Tabela 38 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 91

Tabela 39 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado. 92

Tabela 40 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 97

Tabela 41 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 98

Tabela 42 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de 99

variação.

Tabela 43 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 100

Tabela 44 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 101

Tabela 45 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação. 102

Tabela 46 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos médios de ASC_{0-t} e Cmax para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol. 105

Tabela 47 Parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes. 107

Tabela 48 Intervalo de confiança (IC 95%) para os valores dos parâmetros farmacocinéticos para o (R,S) metoprolol, considerando o regime de tratamento. 108

Tabela 49 Parâmetros farmacocinéticos de (R)-metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes. 109

Tabela 50 Intervalo de confiança (IC 95%) para os valores dos parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol, considerando o regime de tratamento. 110

Tabela 51 Parâmetros farmacocinéticos de (S)-metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes. 111

Tabela 52 Intervalo de confiança (IC 95%) para os valores dos parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol, considerando o regime de tratamento. 112

Tabela 53 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes. 113

Tabela 54 Intervalo de confiança (IC 95%) para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), considerando o regime de tratamento. 114

Tabela 55 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (R,S/S), após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes. 115

Tabela 56 Intervalo de confiança (IC 95%) para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (T/S), considerando o regime de tratamento. 116

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo”
ASC_{0-t}	Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero ao tempo da última concentração quantificável
ASC_{0-inf}	Área sob a curva “concentração plasmática *versus* tempo” do tempo zero extrapolada ao infinito
CC	Curva de calibração
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CL	Clerance
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
C_{max}	Concentração plasmática máxima
CMD	Concentração média determinada
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade Médio
CS	Curva seca
CT	Concentração teórica
r^2	Coeficiente de determinação
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P-450
DI	Diâmetro interno
DP	Desvio-padrão
EC	Eletroforese capilar
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fluorencência
°C	Graus celsius

h	Hora
HIV	Human immunodeficiency virus
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
k_{el}	Constante de velocidade de eliminação do fármaco
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
mM	Milimolar
mm	Milimetro
µg	Microgramas
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mm	Micrômetros
ng	Nanograma
nm	Nanometro
p	Índice de significância
P	Padrão
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
Pi	Peso ideal
RE	Resolução
rpm	Rotação por minuto
t	Tempo
$t_{(1/2)}$	Tempo de meia vida
$t_{(1/2)el}$	Meia-vida de eliminação plasmática do fármaco
TGO	Transaminase glutâmico-oxaloacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
t_{max}	Tempo necessário para C_{max}
UV	Ultra violeta
Vd	Volume de distribuição
v/v	Volume – volume

Resumo

Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não exige a realização de ensaios de bioequivalência utilizando métodos enantiosseletivos de quantificação de fármacos para o registro de medicamentos genéricos ou similares contendo fármacos racêmicos. Porém, existe a possibilidade das diferenças de concentrações plasmáticas dos enantiômeros entre o medicamento referência e os genéricos e/ou similares comercializados no Brasil serem maiores que as estabelecidas pelos limites de bioequivalência. Esse estudo teve a finalidade de investigar a influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol, a partir da forma farmacêutica, sobre o processo de absorção do fármaco total e de seus enantiômeros por meio da avaliação das concentrações plasmáticas de metoprolol total, (S)-metoprolol e (R)-metoprolol, e da relação entre as concentrações dos enantiômeros (S/R) após a administração oral de medicamentos contendo mistura racêmica deste fármaco. Para isso, foi realizado ensaio de biodisponibilidade *in vivo*, em um grupo de 20 voluntários saudáveis, de acordo com procedimentos éticos estabelecidos internacionalmente. Foram empregados três esquemas de administração do metoprolol, com a finalidade de simular diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, na Fase 1 foi administrado uma dose única de 100 mg de metoprolol em solução, na Fase 2 e Fase 3 essa mesma dose foi particionada em duas e cinco administrações, respectivamente, com intervalo de 30 minutos entre elas. Foram coletadas amostras de sangue, e estas foram analisadas utilizando método convencional e método quiral para quantificação do metoprolol total e seus enantiômeros, respectivamente, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de fluorescência. Os parâmetros farmacocinéticos de $ASC_{0\text{-}t}$, $C_{máx}$ e $T_{máx}$ foram utilizados para comparação entre as três velocidades de liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. A análise farmacocinética para o fámaco (R,S) metoprolol e seus enantiômeros e a comparação entre seus parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral do metoprolol, indicam uma cinética enantioseletiva para o metoprolol, que pode ter ocorrido devido a uma biotransformação pré-sistêmica dose-dependente, ou a uma inibição do metabolismo do (S)-metoprolol pela forma (R)-metoprolol;

Palavras chave: Metoprolol, Estudo de Biodisponibilidade, Metódo Bioanalítico Enantioseletivo, Farmacocinética de enantiômeros.

Abstract

Influence of the input rate of metoprolol on the absorption of its enantiomers

ANVISA, brazilian regulatory agency for drug products, does not require the use of enantioselective bioanalytical methods in bioequivalence assays of generic and similar drug products containing racemic drugs. Therefore, it is possible that two formulations are bioequivalent based on plasmatic concentration of total drug, but are not bioequivalent on the basis of the comparison of the data of the stereoisomers. The objective of this study was to investigate the influence of the release rate of metoprolol from the dosage form on its absorption process and on its enantiomers' absorption process by measuring plasmatic concentrations of total metoprolol, (S)-metoprolol and (R)-metoprolol after oral administration of drug products containing racemic metoprolol. An *in vivo* bioavailability study was conducted in a group of 20 healthy volunteers, according to national and international guidelines for biomedical research, in which the administration rate of metoprolol was varied. In Phase 1 a single dose of 100 mg metoprolol was administered in solution, in Phase 2 and Phase 3 the same dose was partitioned into two and five administrations, respectively, with an interval of 30 minutes between them. Blood samples were collected, and these were analyzed using the conventional method and chiral method for quantification of (R,S)-metoprolol and for its enantiomers, using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. The pharmacokinetic parameters AUC_{0-t}, C_{max} and T_{max} were used for comparisons between three different drug release rates. Pharmacokinetic analysis for (R, S) metoprolol and its enantiomers and comparison of their pharmacokinetic parameters obtained after oral administration of metoprolol, to indicate an enantioselective kinetic, which may be due to a biotransformation pre-systemic dose dependent or the inhibition of metabolism of the (S)-form for metoprolol (R)-metoprolol.

Keywords: Metoprolol, Bioavailability Study, Enantioselective Bioanalytical Methods, Stereoselective Pharmacokinetic.

1. INTRODUÇÃO

A quiralidade é um fenômeno que ocorre em muitas moléculas sintéticas utilizadas hoje pelas indústrias de alimentos, de perfumaria, de cosméticos e farmacêuticas, entre outras, por isso a relevância do estudo da estereoquímica. Uma molécula é dita quiral quando apresenta em sua estrutura um ou mais átomos ligados a quatro substituintes diferentes, originando uma orientação tridimensional bem definida (Davies, 2003).

Os isômeros são diferentes compostos com a mesma fórmula molecular, e podem ser classificados em isômeros constitucionais, com mesma fórmula molecular mas diferentes conectividades, e estereoisômeros, isômeros que apresentam a mesma conectividade mas diferem no seu arranjo espacial. Os estereoisômeros podem ser subdivididos em enantiômeros e diasteroisômeros. Os enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares não superponíveis, enquanto os diasteroisômeros são estereoisômeros cujas moléculas não são imagens especulares uma da outra (Smith, 2009).

Os enantiômeros apresentam a mesma estrutura química e as mesmas propriedades físico-químicas, com exceção do desvio do plano da luz polarizada. Os enantiômeros que desviam o plano de luz polarizada no sentido horário recebem a denominação dextrógiro e o sinal (+) e aqueles que desviam no sentido anti-horário recebem a denominação levógiro e o sinal (-). Eles diferem em sua estrutura tridimensional, apresentando-se como imagens especulares não superponíveis. Os enantiômeros ocorrem apenas com compostos cujas moléculas são quirais (Solomons e Fryhle, 2005).

A maioria dos fármacos utilizados na prática clínica são encontrados na forma de misturas racêmicas ou racematos, ou seja, misturas contendo dois enantiômeros complementares na proporção de 50:50. Esses fármacos geralmente apresentam o átomo de carbono como centro assimétrico, porém outros atómos como fósforo e enxofre também possam conferir assimetria à molécula (Leffingwell, 2003).

O conhecimento aprofundado desses fármacos quirais é de grande importância, uma vez que a estereoquímica pode influenciar nas suas características farmacológicas, metabólicas e toxicológicas.

Os processos biológicos envolvem a interação do fármaco com macromoléculas quirais, originando, muitas vezes, propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas entre enantiômeros. No processo de absorção há poucos exemplos de fármacos que apresentam características de enantioseletividade, já que para a maioria deles a transposição das membranas biológicas se dá por transporte passivo. Porém para os fármacos que apresentam absorção dependente de carreador podem-se observar diferenças de absorção entre seus enantiômeros. Em relação aos demais processos farmacocinéticos, há relatos na literatura de numerosos casos onde ocorre ligação estereoseletiva com componentes do sangue ou plasma e proteínas dos tecidos, originando diferenças no volume de distribuição. Para os processos de excreção biliar e urinária, o transporte através de proteínas ou transportadores de cátions e ânions orgânicos pode levar a estereoseletividade no clearance e nos valores de concentração plasmática (Brocks, 2006).

A biotransformação é, na maioria dos casos, a etapa mais afetada pela estereoseletividade, o que pode originar diferenças de *clearance* e concentrações plasmáticas entre enantiômeros. Além disso, a grande variabilidade individual também pode originar diferenças entre os enantiômeros, podendo levar a resultados indesejados e difíceis de prever, como a variação no intervalo terapêutico, a ausência de efeito terapêutico ou aparecimento de efeitos tóxicos em sub-populações específicas. Essas diferenças podem se dar devido ao polimorfismo genético, estado fisiológico e doenças, além de interação com outros fármacos. A indução e inibição enzimática são fatores que também podem afetar um fármaco quiral em diferentes extensões, especialmente quando os enantiômeros sofrem biotransformação através de diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em velocidades diferentes (Tracy, 2002).

Assim sendo, no caso de fármacos que se apresentam como misturas racêmicas, é possível que ocorram diferenças quantitativas e qualitativas de ação farmacológica entre os enantiômeros, bem como diferenças entre seus perfis de decaimento plasmático após a administração da mistura racêmica.

A maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas são comercializados como racematos, muitas vezes devido à falta de tecnologia eficiente na síntese orgânica dos seus enantiômeros, ou por razões econômicas, já que é mais vantajoso produzir a mistura racêmica (Bonato, 2005). Devido a observação das diferentes formas de interação dos enantiômeros no organismo humano, a enantioseletividade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos, bem como em ensaios posteriores, como os de bioequivalência e biodisponibilidade relativa.

As agências regulatórias da produção e comercialização de medicamentos, como o FDA (*Food and Drug Administration*), nos Estados Unidos, EMA (*European Medicine Agency*), na Europa, e os órgãos equivalentes no Japão e Canadá, destacam a necessidade de informaçãos acerca das propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereoseletivas dos fármacos quirais, a fim de garantir sua segurança e eficácia (Federsel, 2003). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ainda não publicou recomendações específicas a esse respeito.

Assim, é de suma importância o estudo dos fatores relacionados à via de administração e as diferentes velocidades de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica para fármacos racêmicos, pois estes podem influenciar no seu processo de absorção, afetando a disposição cinética e a biodisponibilidade de cada enantiômero e, consequentemente, a segurança e a eficácia desses fármacos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ensaios de bioequivalência para medicamentos contendo fármacos racêmicos

Em função das diferenças farmacológicas observadas entre os enantiômeros, a quantificação de fármaco total em fluidos biológicos pode ocasionar falhas na interpretação de dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos e de relação entre concentração e efeito farmacológico (Nation, Sansom, 1994). Conseqüentemente, o emprego de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos para avaliar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de enantiômeros presentes em uma mistura racêmica tornou-se prática comum em ensaios clínicos. Entretanto, o uso destes métodos em ensaios de bioequivalência ainda é controverso, e diversos argumentos favoráveis e desfavoráveis são citados pelos cientistas envolvidos com essa questão (Srinivas, 2004).

Os ensaios de bioequivalência ganharam visibilidade no Brasil principalmente após a promulgação da Lei 9.787, em 10 de fevereiro de 1999, que instituiu o medicamento genérico no Brasil de acordo com as normas internacionais adotadas por países da Comunidade Européia, Estados Unidos e Canadá, além da OMS, e a publicação das Resoluções que estabeleceram os critérios técnicos para seu registro. A Lei 9.787 e as resoluções que a regulamentam revolucionaram o mercado farmacêutico brasileiro e introduziram conceitos como equivalências farmacêutica e terapêutica, biodisponibilidade e bioequivalência. (Bueno, 2005).

A intercambialidade, ou equivalência terapêutica, pode ser demonstrada por métodos convencionais como os ensaios clínicos de longa duração. Entretanto, com o objetivo de economizar recursos financeiros e tempo, e também em virtude de considerações éticas em relação ao elevado número de pacientes envolvidos em tais ensaios, a comparação clínica direta tem sido substituída por avaliações indiretas. Com base no princípio de que curvas semelhantes de decaimento sanguíneo de fármacos produzem o mesmo resultado em termos de eficácia e segurança, realizam-se ensaios de bioequivalência em que a biodisponibilidade do produto candidato a genérico ou similar é comparada à do produto referência. Neste contexto, a

bioequivalência pode ser considerada um substituto da equivalência terapêutica, desde que exista relação bem definida entre concentração do fármaco e efeito terapêutico e segurança (Porta, 1999; Gleiter et al., 1998; Herchuelz, 1996; Meredith, 1996; Nation, Sansom, 1994).

Os ensaios de bioequivalência são realizados em humanos por meio da administração dos medicamentos a serem avaliados, seguida pela determinação das concentrações plasmáticas, séricas ou sangüíneas do fármaco ou metabólito ativo em função do tempo. A partir das curvas de concentração em função do tempo obtidas, determinam-se os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência e que são, basicamente, a concentração sanguínea máxima do fármaco ou metabólito (C_{max}), e a área sob a curva de decaimento sanguíneo (ASC) (Porta, 1999).

Assim, embora normalmente se considere que duas formulações bioequivalentes são terapeuticamente equivalentes, isto pode não ser verdade para alguns produtos contendo fármacos racêmicos: nestes casos, a quantificação de fármaco total, sem discriminação dos enantiômeros, pode não significar equivalência terapêutica (Mehvar, 1997).

Embora exista consenso entre pesquisadores e entre agências reguladoras em relação ao planejamento, execução e interpretação de resultados de ensaios de bioequivalência em geral, o mesmo não acontece quando se trata de ensaios de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos na forma de misturas racêmicas, uma vez que existe grande controvérsia em relação a qual substância deve ser quantificada nos fluidos biológicos dos voluntários (Nation, Sansom, 1994):

- todos os enantiômeros individualmente, por meio de método analítico estereosseletivo;
- apenas o enantiômero ativo, por meio de método analítico estereosseletivo;

- o fármaco total sem distinção entre os enantiômeros, por meio de método analítico não estereosseletivo.

Como reflexo desta situação, observa-se que as agências reguladoras apresentam visões distintas sobre a necessidade de se realizar ensaios de bioequivalência com quantificação de enantiômeros. Assim, enquanto a ANVISA não exige o emprego de métodos bioanalíticos estereosseletivos em nenhuma situação, a agência européia EMA (European Medicine Agency), estabelece que os estudos de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos quirais devem empregar tais métodos, exceto nos casos em que os medicamentos teste e referência contêm o mesmo enantiômero estável ou ambos contêm o racemato e os enantiômeros apresentam farmacocinética linear. As agências Health Canadá, canadense, e FDA (Food and Drug Administration), americana, adotam posições intermediárias: o Health Canada recomenda a quantificação separada dos enantiômeros nos casos em que a velocidade de absorção do fármaco influencia a razão entre os enantiômeros *in vivo*, e o FDA faz esta exigência para estudos de bioequivalência em que todas as condições a seguir estejam presentes:

- os enantiômeros apresentam características farmacodinâmicas diferentes;
- os enantiômeros apresentam características farmacocinéticas diferentes;
- o enantiômero de menor concentração plasmática é o principal responsável pela eficácia e segurança do medicamento;
- a absorção é não-linear, caracterizada por alterações na razão entre os enantiômeros in vivo em decorrência de alterações na velocidade de absorção do fármaco.

Midha e col. (1998) propuseram um algoritmo de decisão (Figura 1) para avaliação da necessidade de emprego ou não de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos em ensaios de bioequivalência. De acordo com esse algoritmo, seria necessário usar tais métodos nas seguintes situações:

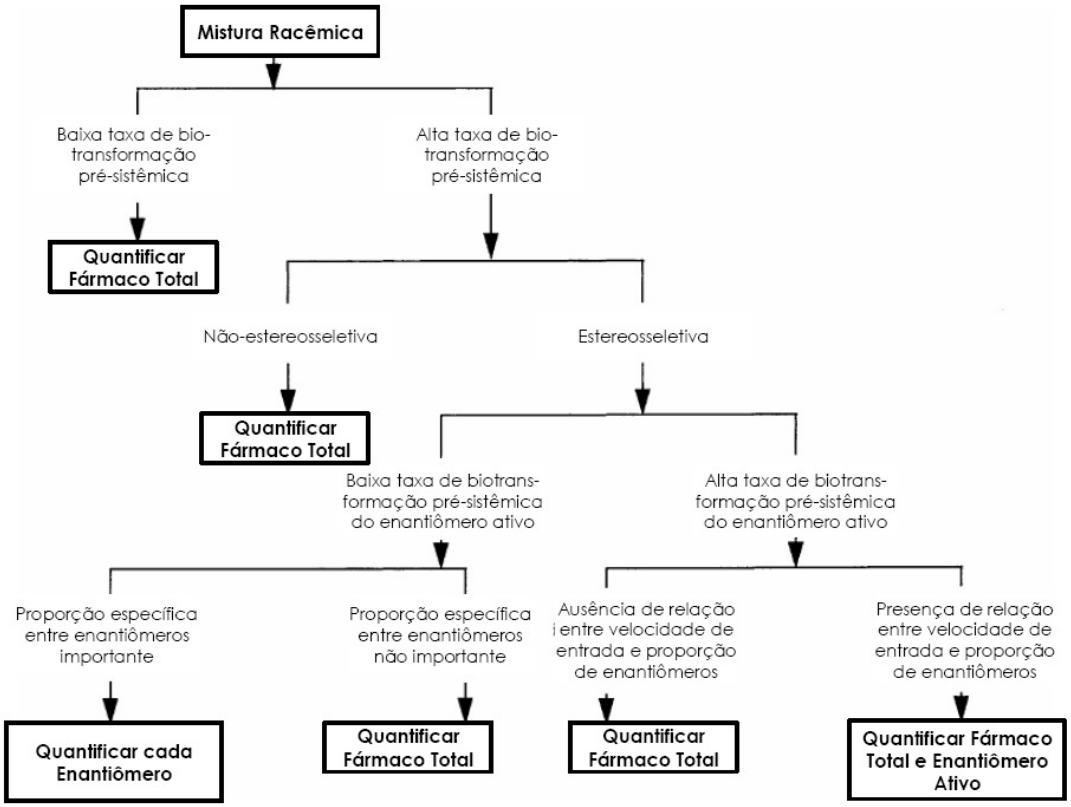

Figura 1: Algoritmo de decisão para avaliação da necessidade de emprego ou não de métodos estereosseletivos de quantificação de fármacos em ensaios de bioequivalência (modificado de Midha et al., 1998).

1. nos casos em que o enantiômero ativo apresente alta taxa de biotransformação pré-sistêmica estereosseletiva e exista relação entre a velocidade de entrada do fármaco no organismo e a proporção entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros (quantificar fármaco total e enantiômero ativo);
2. nos casos em que o enantiômero ativo apresente baixa taxa de biotransformação pré-sistêmica estereosseletiva e a proporção específica entre as concentrações plasmáticas dos enantiômeros seja importante para atingir o efeito terapêutico ótimo (quantificar cada enantiômero separadamente).

De acordo com Srinivas (2004), outras informações, além daquelas relacionadas à biotransformação pré-sistêmica de fármacos racêmicos, são importantes no processo de decisão sobre a utilização ou não de métodos analíticos estereosseletivos:

- saturabilidade do processo de biotransformação pré-sistêmica;
- papel de outros mecanismos ativos ou passivos no processo de eliminação do fármaco (por exemplo, eliminação biliar ou renal) e sua saturabilidade;
- efeitos da ligação a proteínas plasmáticas e de alterações no equilíbrio fármaco livre/fármaco ligado na distribuição e eliminação dos enantiômeros.

Por meio dessas informações é possível obter uma melhor compreensão da farmacocinética dos enantiômeros em diferentes dosagens (dentro da faixa terapêutica) e diferentes velocidades de entrada no organismo (comprimidos, cápsulas, soluções) (Srinivas, 2004).

Em outro trabalho, Mehavar e Jamali (1997) recomendam a utilização de métodos enantiosseletivos em estudos com racematos de farmacocinética não-linear ou cujos enantiômeros apresentem diferenças significativas de perfis farmacocinéticos, mesmo que a farmacocinética seja linear. Adicionalmente, os autores sugerem a mesma abordagem no caso de fármacos que sofrem inversão quiral (conversão de um enantiômero no outro) *in vivo*. Os métodos não estereosseltivos seriam empregados na avaliação de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos de farmacocinética linear e pouco estereosseletiva.

As diferenças nas propriedades farmacodinâmicas dos enantiômeros tornam possível que a concentração total de fármaco, obtida por meio de método analítico não estereosseletivo, não apresente correlação com a intensidade do efeito farmacológico, ou com a eficácia do produto. Nestes casos, o ensaio de bioequivalência deveria ser conduzido utilizando-se métodos estereosseletivos (Sahajwalla, 2004). Entretanto, uma vez que os limites estabelecidos pelas agências reguladoras para fármacos

bioequivalentes são bastante amplos, permitindo uma variação de 20% entre os medicamentos testados, questiona-se se as eventuais diferenças entre enantiômeros não estariam incluídas nesses limites e, portanto, seria possível prescindir da utilização de métodos enantiosseletivos em ensaios de bioequivalência. Diversos ensaios de bioequivalência de medicamentos contendo fármacos racêmicos descritos na literatura indicam que as diferenças entre enantiômeros podem extrapolar os limites estabelecidos para a bioequivalência (Srinivas, 2004).

Garcia-Arieta e colaboradores (2005) realizaram ensaio de bioequivalência de formulações contendo ibuprofeno racêmico com quantificação do fármaco total por método não estereosseltivo e dos dois enantiômeros (S-ibuprofeno e R-ibuprofeno) por método estereosseletivo. Os produtos testados foram bioequivalentes tanto para o fármaco total como para os enantiômeros, entretanto a proporção entre os dois enantiômeros (S/R) no plasma foi diferente para os dois produtos testados.

Formulações contendo clorfeniramina, outro fármaco disponível na forma de mistura racêmica, foram submetidas a ensaio de bioequivalência descrito por Hiep e colaboradores (2000). Neste estudo, os autores comprovaram bioequivalência entre as formulações com o emprego de método não estereosseltivo de quantificação de clorfeniramina no plasma, mas ausência de bioequivalência com o emprego de método estereosseletivo.

Esta diferença foi observada também por Srinivas e colaboradores (1996) em estudo de bioequivalência entre formulações contendo nadolol: o emprego de método não estereosseletivo levou à conclusão de bioequivalência entre as formulações, enquanto que o emprego de método estereosseletivo originou resultados que indicaram a ausência de bioequivalência entre as mesmas formulações.

Os fármacos racêmicos sujeitos a processos saturáveis, especialmente durante a fase de absorção (absorção por transporte ativo, inversão quiral *in vivo* mediada por enzimas, biotransformação pré-sistêmica) e cujos enantiômeros apresentam diferenças farmacocinéticas, estão sujeitos a

alterações na proporção entre os enantiômeros no plasma em função da velocidade de introdução do fármaco no organismo. Boni e colaboradores (2000) avaliaram se os valores de $C_{máx}$ de (S) - e (R,S) - etodolac são afetados pela taxa de absorção, observando que o decréscimo na taxa de absorção diminui significativamente a razão de C_{max} entre o enantiômero (S) - e fármaco total (R,S) -, devido a diferenças na saturação enantioseletiva da absorção e nas diferenças na ligação com as proteínas.

Portando os processos farmacocinéticos de absorção no trato gastrintestinal, distribuição nos tecidos e filtração glomerular são dependentes das propriedades físico-químicas da molécula do fármaco. Uma vez que essas propriedades são as mesmas para ambos os enantiômeros, não observa-se enantioseletividade nesses processos. Entretando, em processos onde ocorre a interação com macromoléculas opticamente ativas, como no caso de absorção mediada por transportadores, ligação às proteínas plasmáticas, excreções biliar e renal e nos processos de biotransformação, observa-se diferentes comportamentos para os enantiômeros (Tucker, 1990).

A via de administração e velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica são pontos relevantes nesse aspecto, já que no caso de moléculas que sofrem baixa biotransformação hepática, a enantioseletividade ocorre tanto após a administração oral quanto na intravascular, já que as diferenças no clearance intríseco são diretamente relacionadas ao do clearance hepático. Enquanto que para fármacos que sofrem alta biotransformação hepática, na administração intravascular o clearance hepático é dependente do fluxo de sangue hepático e não do clearance intrínseco. Então as diferenças observadas na razão entre os enantiômeros de fármacos com alta biotransformação hepática está relacionada à administração por via oral. Esse processo de biotransformação hepática é, portanto, um parâmetro farmacocinético crítico na enantioseletividade de um fármaco, e pode-se manisfestar tanto nas reações enzimáticas de fase I e fase II, quanto nas reações que levam à produção de metabólitos quirais a partir de fármacos não quirais (Mistry, 2002).

Fármacos quirais com farmacocinética linear apresentam suas razões

enantioméricas de área sob a curva (ASC) constantes para diferentes doses e formas farmacêuticas, indicando que a extensão e velocidade de absorção dos enantiômeros estão diretamente relacionadas com as da forma racêmica. Porém os parâmetros de concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e de tempo para se atingir esta concentração ($T_{máx}$) pode diferir entre os enantiômeros e o fármaco total. Enquanto na farmacocinética não-linear, a razão entre os valores de ASC para os enantiômeros pode ser dependente da velocidade e extensão de absorção do fármaco (Kroemer, 1996).

Essa farmacocinética não-linear pode ocorrer devido a enantioseletividade no processo de biotransformação ou excreção, resultando em razões enantioméricas de ASC distintas. No caso de enantioseletividade na ligação às proteínas plasmáticas essa razão enantiomérica pode ser afetada para o $C_{máx}$, dependendo da velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica (Tucker, 1990).

Assim, a determinação dos parâmetros farmacocinéticos para os fármacos racêmicos e enatiômeros isolados é de grande importância para a farmacologia clínica, a fim de definir e controlar uma possível variabilidade das respostas dos indivíduos e nas definições dos parâmetros biofarmacotécnicos no desenvolvimento do produto farmacêutico.

2.2 Metoprolol

O metoprolol [1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol] é um antagonista seletivo do receptor β1 adrenérgico, que possue um centro assimétrico em sua cadeia (Figura 2), e é administrado na forma de mistura racêmica, sendo utilizado no tratamento de hipertensão arterial sistêmica, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Mostafavi e Foster, 2000).

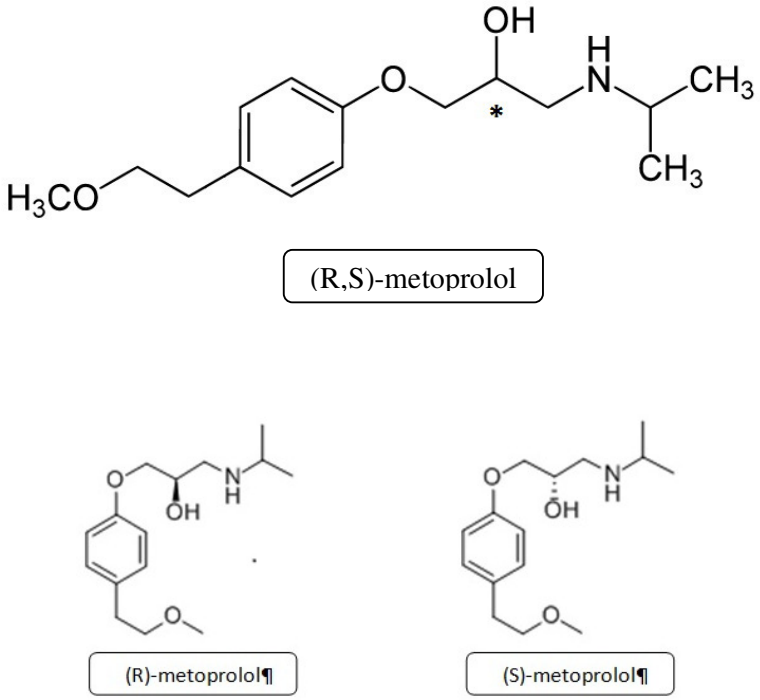

Figura 2: Estrutura do fármaco metoprolol e seus enantiômeros.

Fármacos β-bloqueadores ocupam os receptores β-adrenérgicos e reduzem, competitivamente, a ligação de catecolaminas e β-agonistas pelo receptor (Katzung, 2006). Parece provável que um conjunto de mecanismos contribua para o efeito benéfico dos β-bloqueadores na insuficiência cardíaca crônica (Papadoupoulos e Papademetriou, 2009). Os possíveis mecanismos mais importantes incluem a redução dos níveis circulantes de vasoconstritores; reduções na pressão arterial, frequência cardíaca e consumo de oxigênio pelo miocárdio; diminuição da densidade de receptores β1-adrenérgicos do miocárdio; redução na produção de genes de citocinas inflamatórias do miocárdio; efeitos favoráveis sobre a remodelação cardíaca; aumento da perfusão diastólica; e normalização da expressão de vários genes do miocárdio envolvidos no desenvolvimento de hipertrofia patológica (Kubon, 2011).

O metoprolol reduz a pressão arterial elevada, e o aumento de pressão arterial que ocorre em resposta a exercícios físicos. O tratamento resulta, inicialmente, em aumentos na resistência vascular periférica, que durante a administração a longo prazo é normalizada ou, em alguns casos, reduzida.

Como para os demais beta-bloqueadores o mecanismo farmacológico anti-hipertensivo ainda não está completamente elucidado, no entanto, a redução da pressão arterial a longo prazo, observada com metoprolol, parece ser paralela ao decréscimo gradual na resistência periférica total. Nos pacientes com angina o metoprolol reduz a freqüência e a gravidade dos episódios isquêmicos e aumenta a capacidade de trabalho físico. Esse efeito benéfico pode ser causado pelo decréscimo na demanda de oxigênio do miocárdio que ocorre em resposta à redução da freqüência cardíaca e à contratilidade do miocárdio. Já em pacientes com taquicardia supraventricular, com fibrilação atrial, com extra-sístoles ventriculares ou outra arritmia ventricular, o metoprolol tem efeito regulador sobre a freqüência cardíaca. Sua atividade antiarrítmica deve-se, principalmente, à inibição da automaticidade das células marcapasso e ao prolongamento da condução atrioventricular (Regardh, 1980).

Por seu efeito beta-bloqueador, o metoprolol é adequado para o tratamento de distúrbios cardíacos funcionais com palpitação, para prevenção de enxaqueca e tratamento coadjuvante do hipertireoidismo. O tratamento crônico com metoprolol pode reduzir a sensibilidade à insulina, no entanto, metoprolol interfere em menor grau na liberação de insulina e no metabolismo dos carboidratos, quando comparado aos beta-bloqueadores não seletivos. Estudos de curta duração demonstraram que o metoprolol pode alterar o perfil lipidico sanguíneo e levar a um aumento dos triglicérides e à diminuição dos ácidos graxos livres, porém em extensão menor do que o observado em betabloqueadores não seletivos.

Em relação a sua farmacocinética, a absorção do metoprolol após administração por via oral é praticamente completa, apesar de a sua biodisponibilidade ser baixa, cerca de 40%, devido a sua significante eliminação pré-sistêmica (Goodman e Gilman, 2006). O metoprolol é principalmente eliminado pelo metabolismo hepático através de reações de α-hidroxilação (α-hidroximetoprolol) e de O-desmetilação (O-dimetilmetoprolol) e apenas 10 ± 3% do fármaco administrado são recuperados na urina de forma inalterada (Cerqueira, 2003). A formação da α-hidroximetoprolol e de parte do O-dimetilmetoprolol são dependentes da CYP2D6 (debrisoquina/esparteína), do complexo citocromo P450, responsável pelo polimorfismo oxidativo das

enzimas que divide a população caucasiana em metabolizadores extensos e em metabolizadores deficientes. O metoprolol possui tempo de meia vida de 3,2 ± 0,2 horas. A ligação do fármaco às proteínas plasmáticas é quase insignificante, com valores reportados de 11 ± 1%. Seu volume de distribuição é de 4,2 ± 0,7 $L.Kg^{-1}$. As concentrações plasmáticas do fármaco podem variar amplamente (até 17 vezes), devido a diferenças geneticamente determinadas nas taxas de metabolismo já citadas. A concentração máxima atingida do metoprolol é de 99 ± 53 $ng.mL^{-1}$ para metabolizadores extensos e de 262 ± 29 $ng.mL^{-1}$ para metabolizadores deficientes em um tempo de concentração máxima de 2 e 3 horas, respectivamente. O metoprolol possui um clearance de 15 ± 3ml x min^{-1} x Kg^{-1} (Mehvar, 2001 e Cerqueira, 1999)

Dados disponíveis sobre a ação farmacológica de fármacos beta bloqueadores indicam que a interação desses agentes com beta-adrenoceptores é altamente estereosseletiva (Mehvar e Brocks, 2001). Assim como a maioria dos betabloqueadores, a afinidade do metoprolol por receptores β1-adrenérgico é significantemente maior para o (S)-metoprolol (Lanchote, 2000) sendo este, portanto, o enantiômero ativo (Seeringer, 2008).

No entanto, a estereosseletividade do fármaco pode ser melhor observada em relação ao seu metabolismo, que gera algumas diferenças farmacocinéticas entre os dois enantiômeros (Quadro 1). O metoprolol é predominantemente eliminado pelo metabolismo hepático. Nos humanos, as principais vias metabólicas são a O-desmetilação, a α-hidroxilação e a desaminação oxidativa. Estudos sugerem que há enantiosseletividade nas vias de metabolização O-desmetilação e α-hidroxilação sendo esta estereosseletiva para o (S)-metoprolol (Seeringer, 2008). A maior via metabólica, no entanto, é a O-desmetilação que favorece a metabolização do (R)-metoprolol, sendo assim, responsável pela estereosseletividade observada nas concentrações plasmáticas do metoprolol (Cerqueira, 2003; Mehvar e Brocks, 2001).

Quadro 1: Parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do metoprolol após a administração do racemato.

Parâmetros farmacocinéticos	(R)-metoprolol	(S)-metoprolol
Cmáx (nm l^{-1})	235 ±138	227 ± 132
$AUC_{0-\infty}$ (ng h l^{-1})	97	83
$CL_{p.o.}$ (l min^{-1} kg^{-1})	1.99	2.26
$T_{1/2}$ (min)	35	35
V_d/F (l kg^{-1})	63	76

O metoprolol apresenta diversas características que o colocam como fármaco para o qual é recomendável o emprego de método enantiosseletivo em ensaios de bioequivalência (Cerqueira, 2003, Sandberg 1993). Seus enantiômeros exibem diferenças farmacodinâmicas, uma vez que a afinidade do enantiômero (S)-metoprolol pelo receptor de subtipo β_1-adrenérgico é significativamente maior (cerca de 500 vezes) que a do (R)-metoprolol (Wahlund et al, 1990). Além da afinidade estereoseletiva pelo receptor, são observadas também diferenças em relação ao clearance, ligação às proteínas e tecidos, metabolismo e interação com outros fármacos. Sendo assim, podemos considerar que a utilização clínica do racemato é equivalente à administração de dois fármacos com diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Kim et al, 2000).

Para fármacos com metabolismo pré-sistêmico, como acontece com o metoprolol, a razão entre os valores de ASC de cada enantiômero pode ser afetada pela velocidade de absorção do fármaco. Se os enantiômeros de um fármaco quiral são absorvidos pelo trato gastrintestinal por um mecanismo saturável, como absorção através de carreadores, os resultados de estudos de bioequivalência com quantificação do fármaco total não podem ser extrapolados para os enantiômeros individuais, já que esse tipo de absorção é enantiosseletivo (Mehvar et al, 1997). Além disso, a ausência de linearidade na

ligação enantiosseletiva de um fármaco às proteínas plasmáticas ou teciduais pode resultar em alterações nas razões enantioméricas de concentrações plasmáticas dependendo da velocidade de liberação do fármaco da formulação farmacêutica (Mistry, Leslie e Eddington, 2002).

Alguns trabalhos apontam as diferenças quirais observadas para o metoprolol, como em um estudo de bioequivalência realizado por Menon e colaboradores, onde eles compararam uma formulação teste de 50 mg do enantiômero ativo (S)-metoprolol com uma formulação referência de 100 mg de metoprolol racêmico. O enantiômero (S)-metoprolol foi quantificado utilizano método quiral por LC/MS/MS. O estudo foi realizado utilizando 24 voluntários homens, o valor de $C_{máx}$ (ng/ml), $T_{máx}$ (h), ASC_{0-t} (ng/ml.h) e $ASC_{0-\infty}$ (ng/ml.h) para as formulações de referência e teste foram 50,03 e 53,76; 1,86 e 2,17; 352,24 e 387,92 e 363,75 e 402,55, respectivamente para (S)-metoprolol. A proporção de médias ajustadas para $C_{máx}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ foram de 98,96%, 103,38% e 103,88% respectivamente. Como resultado observaram que as duas formulações teste e referência foram bioequivalentes (Menon, et al 2011).

Wormke e colaboradores realizaram um estudo de bioequivalência a fim de avaliar duas formulações de liberação prolongada, contendo 190 mg de succinato de metoprolol racêmico. As formulações de liberação prolongada exibiram uma taxa de absorção reduzida, e foram bioequivalentes entre si (Wromke, et al 2012).

Estão disponíveis, no mercado brasileiro, medicamentos genéricos e similares contendo metoprolol na forma de mistura racêmica. Como não é exigida pela ANVISA a realização de ensaios com métodos enantiosseletivos de quantificação de fármacos para avaliar a bioequivalência entre essas formulações, existe a possibilidade de diferenças entre as concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol e (R)-metoprolol serem maiores que as estabelecidas pelos limites de bioequivalência. Esta pode ser, inclusive, uma possível explicação para diferenças de ação entre medicamentos referência e genérico relatadas por alguns pacientes e médicos. Desta forma, justifica-se a realização de investigação científica para avaliar a influência de diferenças farmacotécnicas, como a velocidade de liberação do fármaco da formulação,

na farmacocinética do metoprolol total e de seus enantiômeros, (S)-metoprolol e (R)-metoprolol e na avaliação de bioequivalência entre diferentes formulações.

2.3 Métodos enantioméricos de quantificação de fármacos

Para uma análise eficiente e precisa das diferenças biológicas observadas entre os enantiômeros de um fármaco quiral, é necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para a determinação das concentrações desses enantiômeros em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas. As técnicas mais utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) (Bonato e Jabor, 2005).

A técnica de cromatografia líquida é a mais empregada para a separação dos enantiômeros, e ela ocorre pelo uso de fases móveis contendo aditivos quirais, pelo uso de fases estacionárias quirais, ou por processo de derivatização com reagentes quirais e posterior análise por método não quiral (Schimid e Gubitz, 2011). Nas colunas quirais, os enantiômeros são retidos de formas distintas, e a separação depende da formação de diastereoisômeros transitórios na superfície da fase estacionária. Aquele que formar o diastereoisômero mais estável ficará mais retido na fase estacionária, enquanto o outro formará um diastereoisômero menos estável e será eluído mais rapidamente. As forças responsáveis por essa separação são muito fracas e requerem otimização por ajustes de fase móvel e temperatura para obter uma melhor seletividade (Beesley, 2011).

As interações intermoleculares envolvidas no reconhecimento quiral são do tipo polares/iônico, pi-pi, ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Essas interações podem ser aumentadas pela formação de complexos de inclusão e de ligação a sítios específicos, como peptídeos (Gubitz, 1990). O

analista pode, ainda, maximizar essas interações através de fases móveis adequadas ou ajustes de pH. O controle da temperatura é outro fator importante na separação quiral, sendo que temperaturas mais baixas aumentam o reconhecimento quiral (Srinivas, 2004).

O tipo de fase estacionária utilizada para separar uma classe de enantiômeros é muitas vezes específica, e combinada ao alto custo dessas colunas quirais fazem da decisão de qual coluna utilizar uma etapa muito importante. As colunas quirais são classificadas de acordo com o mecanismo de interação com o analito, e podem ser dos tipos brush (Pirkle), celulose, ciclodextrina, antibióticos macrocíclico, proteínas, cavidade de inclusão, entre outras (Ahuja, 2000).

Nos últimos tempos, inúmeros seletores quirais foram desenvolvidos, sendo avaliados tanto para verificar suas habilidades de resolução quiral, quanto para serem empregadas no preparo de fases estacionárias quirais. As fases mais promissoras estão disponíveis comercialmente e são empregadas para aplicações diversas. As fases estacionárias quirais pode ser classificadas de acordo com seu mecanismo de interação com o analito (Li, 2006). Elas podem ser classificadas como:

- Tipo I, que são aqueles que diferenciam os enantiómeros pela formação de complexos com base em interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo.

- Tipo II, que são aquelas que envolvem uma combinação de interações intermoleculares e complexos de inclusão para produzir uma melhor separação. Esse tipo de fase são derivados de celulose.

- Tipo III, possuem cavidades quirais onde o analito é retido formando um complexo de inclusão.

- Tipo IV, a separação se dá por meio de formação de complexos diastereoméricos com metais.

- Tipo V, são derivadas de proteínas e a separação é dependente de uma combinação de interações hidrofóbicas e polares.

Todos esses fatores combinados permitem o desenvolvimento de um método sensível e seletivo para a determinação quantitativa e qualitativa dos enantiômeros, sendo assim uma importante ferramenta para realização de estudos dos fármacos quirais e seus metabólitos.

Vários trabalhos foram realizados utilizando cromatografia quiral para analise de metoprolol e demais beta bloqueadores, como Ali e colaboradores, que realizaram a análise quiral de vários beta bloqueadores, alprenolol, carazolol, metoprolol e oxprenolol, em plasma humano. Foi utilizada coluna do tipo celulose, CelluCoat®, com fase móvel composta por n-heptano:etanol:dietilamina (v/v/v), o método foi eficiente para a resolução quiral de todos os analitos, e tinha como finalidade a utilização em ensaios farmacocinéticos e de desenvolvimento de novos fármacos quirais (Ali, 2011).

Um outro método quiral foi desenvolvido por Jesen e colaboradores, utilizando LC/MS/MS, para quantificar os enantiômeros do metoprolol em plasma humano na faixa de 0,5 a 50 $\mu g.mL^{-1}$. A separação dos enantiômeros foi realizando utilizando coluna Chirobiotic T®, com fase móvel constituida de metanol:ácido acético:amônia (100:0,15:0,15; v/v/v). O método se mostrou eficiente na quantificação dos enantiômeros do metoprolol em plasma humano, para aplicação em ensaios clínicos (Jesen, 2008).

Svensson e colaboradores, avaliaram a influência da concentração de metanol, temperatura da coluna e pressão na coluna, no método quiral comparando as colunas Chiralcel OD® e Chiralpak AD®, utilizando fluído supercrítico. Eles observaram que a temperatura da coluna teve um maior efeito sobre a enanteosselectividade que o teor de metanol. Mudanças no sistema de pressão do sistema de fluído supercrítico não teve influência significativa sobre enantiosseletividade.

Singh e colaboradores desenvolveram um método quiral para quantificação de atenolol e metoprolol, utilizando uma coluna Chiralcel OD®,

com fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2, v/v/v/v). O metódo se mostrou eficiente para a quantificação dos fármacos em comprimidos, para controle de qualidade das formas farmacêuticas (Singh, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo

O presente estudo tem como objetivo investigar a influência da velocidade de liberação do metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre o processo de absorção do fármaco total e dos enantiômeros (S)-metoprolol e (R)-metoprolol sobre a relação entre as concentrações plasmáticas destes enantiômeros.

3.2 Objetivos específico

- Desenvolver método bioanalítico para a quantificação de (R,S) metoprolol em amostras de plasma humano, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;

- Desenvolver método enantioseletivo para quantificação dos enantiômeros R-metoprolol e S-metoprolol em amostras de plasma humano, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência;

- Realizar análise farmacocinética para o fámaco (R,S) metoprolol e seus enantiômeros e comparar os parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral do metoprolol;

- Verificar se diferentes tratamentos simulando velocidades de liberação diferentes, do fármaco metoprolol, causam influência nas relações entre as concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substância química padronizada

- Metoprolol: (±) – tartarato de metoprolol, lote 018k0760, teor 99%, Sigma-Aldrich.
- Enantiômero (R)–metoprolol, lote I2011, Santa Cruz Biotechnology.
- Enantiômero (S)–metoprolol, lote I2311, Santa Cruz Biotechnology.

4.1.2 Medicamento

Foram utilizados utilizados comprimidos de tartarato de metoprolol.

- Produto: Lopressor ® - comprimido 100 mg de tartarato de metoprolol
- Laboratório: Novartis
- Lote: Z0026
- Fabricação: 02/2011
- Validade: 01/2014

4.1.3 Reagentes e solventes

Foram empregados, no desenvolvimento do presente estudo, os seguintes reagentes e solventes:

- Padrão secundário de atenolol;
- Padrão secundário de propranolol;
- Padrão secundário de fluoresceína;
- Padrão secundário de ofloxacino;

- Acetonitrila grau HPLC, Merck;
- Metanol grau HPLC, Merck;
- Hexano grau HPLC, Merck
- Etanol grau HPLC, Carlo Erba
- Trietilamina ps., Vetec;
- Ácido trifluoroacético pa, Merck;
- Ácido fosfórico 85,0% pa, Synth;
- Fosfato de potássio monobásico, Merck;
- Dietilamina, Merck
- Água purificada obtida em equipamento de osmose reversa, Gehaka®;
- Água ultrapura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
- Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Milex em polietileno com membrana de PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro, N. AJO-4287, C 18 4 x 3,0 mm
- Coluna cromatográfica Phenomenex, C18 modelo Gemini (150 x 4,6 mm, 5 µ di);
- Coluna cromatográfica Phenomenex, Phenyl-2 modelo Hypersil (150 x 4.6 mm, 5 µ di);
- Coluna cromatográfica Kinetex C18 (100 x 4,6 mm, 2.6 µ di);
- Pré-coluna C18/14, n.AJO-4287, C 18 4 x 3,0 mm;
- Coluna quiral Chiralcel OD-R (150 mm x 4,6 mm, 5 µ di), Daicel Chemical Industries LTD;
- Nitrogênio White Martins

4.1.4 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi, composto por uma bomba L7100, injetor automático de amostras L7200, detector UV L7400 e FL L7485, e forno de coluna L7300;
- Balança analítica modelo AX200, Shimadzu;
- pHmetro HI221, Hanna instruments;
- Banho ultrassônico USC 2800, Unique;
- Banho-maria
- Agitador de tubos tipo vórtex
- Sistema de filtração a vácuo, Sartorius;
- Pipetas atomáticas Transferpette, Brand;
- Centrífuga

4.1.5 Materiais

- Balões volumétricos de vidro Pirex®;
- provetas de vidro Pirex®;
- tubos de ensaio de vidro de 10 mL com rolha esmerilhada;
- tubos cônicos de vidro de 10 mL;
- frascos de polipropileno de 4 mL;
- ponteiras de polipropileno descartáveis Brand® para pipetas automáticas;
- Material médico-hospitalar:
    - seringas descartáveis BD de 5 e 10 mL;
    - agulhas descartáveis BD 25x7 mm
    - escalpe BD 21 G

- cateteres intravenosos periféricos Safe-t-intima® 20G, 22G e 24G;
- cateteres intravenosos periféricos Gelco® 20G, 22G e 24G;
- heparina sódida frasco-ampola 5000 UI Ariston;
- algodão hidrófilo não estéril Cremer;
- soro fisiológico 0,9 % de 250 e 500 mL;
- álcool 70° de 100 mL;
- coletores para artigos descartáveis Descartex® 3 e 7 litros;
- luvas para procedimento não estéreis Supermax®;
- tubos para coleta de sangue Vacutainer® de 10 mL contendo heparina.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de (R,S) metoprolol em plasma humano

O desenvolvimento de um método analítico envolve a otimização de várias etapas, como preparação da amostra e condições cromatográficas. O método de quantificação deve ser específico para cada analito, ou seja, apresentar separação cromatográfica livre de interferentes.

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes biológicas (soro, plasma, sangue, urina), em geral, requer um pré-tratamento da amostra, devido à complexidade das matrizes biológicas. A existência de proteínas, que são incompatíveis com as colunas cromatográficas, e a necessidade de concentração das substâncias a serem analisadas, tornam necessário o desenvolvimento e otimização das técnicas de extração e/ou pré-concentração, tornando possível a análise dos componentes de interesse.

Estão descritos na literatura alguns métodos para a quantificação do metoprolol em plasma, por meio de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) com detecção ultravioleta e de fluorescência. A partir desses estudos, foram testadas as variáveis (padrão interno, fase móvel, método de detecção e coluna) e avaliados os resultados (tempo de retenção, resolução dos picos e seletividade).

Para o desenvolvimento do metódo foi avaliado o efeito de diferentes fatores, como porcentagem de solvente orgânico - acetonitrila e/ou metanol - e composição da fase-móvel, pH, coluna e fluxo de fase-móvel.

Foram testados os padrões internos propranolol, atenolol, fluoresceína e ofloxacino, bem como as colunas cromatográficas Phenomenex C18 modelo Gemini e Phenyl-2 modelo Hypersil, ambas com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm; e a coluna Kinetex C18 com 100 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 2.6 µm.

Todas as condições foram testadas utilizando detecção por ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e por fluorescência nos comprimentos de onda de 230 (excitação) e 305 nm (emissão) para o metoprolol. Para as análises foram utilizadas soluções preparadas em água:metanol (90:10), na concentração de 250 $ng.mL^{-1}$ para o metoprolol, e na concentração de 100 $ng.mL^{-1}$ para as substâncias testadas como padrão interno, atenolol, propranolol, fluoresceína e ofloxacino.

A partir dos resultados dos ensaios realizados o método foi desenvolvido e validado para quantificação de metoprolol em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, após extração por precipitação de proteínas, utilizando acetonitrila, e ofloxacino como padrão interno (PI).

4.2.1.1 Preparo da solução estoque padrão e soluções de trabalho padrão de metoprolol

Preparou-se solução estoque padrão de metoprolol na concentração de 250 $\mu g.mL^{-1}$ em água:metanol (10:90, v/v). Esta solução foi acondicionada em frasco de vidro âmbar e armazenada em freezer à temperatura de -20ºC.

As soluções de trabalho padrão de metoprolol foram preparadas a partir da solução estoque padrão, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com água:metanol (90:10, v/v), conforme descrito no Quadro 2 As soluções obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenada em geladeira à temperatura de 4ºC.

Quadro 2: Preparo das soluções de trabalho padrão de metoprolol.

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão	Volume de solução estoque padrão	Volume final	Concentração final
CS1	250 $\mu g.mL^{-1}$	100 µL	1000 mL	25 $ng.mL^{-1}$
CS2	250 $\mu g.mL^{-1}$	100 µL	250 mL	100 $ng.mL^{-1}$
CS3	250 $\mu g.mL^{-1}$	100 µL	100 mL	250 $ng.mL^{-1}$
CS4	250 $\mu g.mL^{-1}$	100 µL	50 mL	500 $ng.mL^{-1}$
CS5	250 $\mu g.mL^{-1}$	500 µL	100 mL	1250 $ng.mL^{-1}$
CS6	250 $\mu g.mL^{-1}$	500 µL	50 mL	2500 $ng.mL^{-1}$

4.2.1.2 Preparo de amostras de plasma padrão da curva de calibração

As amostras de plasma padrão da curva de calibração foram preparadas diariamente a partir de soluções de trabalho padrão de 25 $ng.mL^{-1}$, 100 $ng.mL^{-1}$, 250 $ng.mL^{-1}$, 500 $ng.mL^{-1}$, 1250 $ng.mL^{-1}$ e 2500 $ng.mL^{-1}$ de metoprolol em água:metanol (90:10, v/v). Tomaram-se alíquotas de 50 µL de solução de trabalho padrão de metoprolol e 20 µL de solução-padrão de ofloxacino a 100 $ng.mL^{-1}$ em água:metanol (90:10, v/v). Adicionaram-se 200 µL de plasma branco e as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos. O Quadro 3 apresenta as diluições realizadas para obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Quadro 3: Preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração

Amostra de plasma padrão	Concentração da solução padrão	Volume de solução padrão	Volume de plasma branco	Concentração final
CC1	25 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	5 $ng.mL^{-1}$
CC2	100 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	20 $ng.mL^{-1}$
CC3	250 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	50 $ng.mL^{-1}$
CC4	500 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	100 $ng.mL^{-1}$
CC5	1250 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	250 $ng.mL^{-1}$
CC6	2500 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	500 $ng.mL^{-1}$

4.2.1.3 Preparo das soluções de trabalho padrão de controle de qualidade

As soluções de trabalho padrão de controle de qualidade foram preparadas a partir da solução estoque padrão de metoprolol na concentração de 250 $\mu g.mL^{-1}$, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com água:metanol (90:10, v/v), conforme descrito no Quadro 4. As soluções obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenada em geladeira à temperatura de 4ºC.

Quadro 4: Preparo das soluções padrão de controle de qualidade (CQ) de metoprolol.

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão	Volume de solução estoque padrão	Volume final	Concentração final
CQA	250 $\mu g.mL^{-1}$	400 µL	50 mL	2000 $ng.mL^{-1}$
CQM	250 $\mu g.mL^{-1}$	400 µL	100 mL	1000 $ng.mL^{-1}$
CQB	250 $\mu g.mL^{-1}$	200 µL	1000 mL	50 $ng.mL^{-1}$

4.2.1.4 Preparo de amostras de plasma de controle de qualidade

Para preparação das amostras de plasma de controle de qualidade alto (CQA, 400 $ng.mL^{-1}$), médio (CQM, 200 $ng.mL^{-1}$) e baixo (CQB, 10 $ng.mL^{-1}$) transferiram-se alíquotas de soluções de trabalho padrão de metoprolol em água:metanol (90:10, v/v), nas concentrações de 50 $ng.mL^{-1}$, 1000 $ng.mL^{-1}$ ou 2000 $ng.mL^{-1}$, conforme descrito no Quadro 4, para balões volumétricos de 25 mL. A seguir, adicionou-se lentamente o plasma branco e homogeneizou-se gentilmente para evitar a formação de espuma. Após completar o volume agitou-se vigorosamente para garantir a homogeneização.

Após o preparo, estas soluções foram aliquotadas em frascos de polipropileno de 2 mL e armazenadas em freezer a - 20°C.

Quadro 5: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade

Amostra de plasma de controle de qualidade	Concentração da solução de trabalho padrão	Volume de solução de trabalho padrão	Volume de plasma branco	Concentração final
CQA	2000 $ng.mL^{-1}$	5 mL	25 mL	400 $ng.mL^{-1}$
CQM	1000 $ng.mL^{-1}$	5 mL	25 mL	200 $ng.mL^{-1}$
CQB	50 $ng.mL^{-1}$	5 mL	25 mL	10 $ng.mL^{-1}$

4.2.1.5 Tratamento das amostras de plasma para quantificação de metoprolol

Para o procedimento de purificação das amostras de plasma branco, amostras de plasma padrão da curva de calibração, amostras de plasma de controle de qualidade e amostras de plasma de voluntários após administração

oral de metoprolol foi utilizado o método de precipitação de proteínas com acetonitrila.

Às amostras de plasma padrão da curva de calibração (preparadas conforme indicado no item 4.2.1.3) foram adicionados 3mL de acetonitrila. Para as demais amostras foram adicionados, em tudo de ensaio, 250 µL de plasma e 20 µL da solução do padrão interno (ofloxacino 100 $ng.mL^{-1}$). Em seguida, todas as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 1 minuto. Após centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm, as amostras foram filtradas, transferidas para tubos cônicos e evaporadas em corrente de nitrogênio a 45°C em banho maria. As amostras foram ressuspendida em 250 µL de fase móvel para injeção em CLAE.

4.2.1.6 Condições cromatográficas para quantificação (R,S)-metoprolol em plasma humano

Empregou-se para separação coluna cromatográfica Phenomenex C18 modelo Gemini 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm.

A fase móvel foi composta por uma mistura de água e metanol (70:30, v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoroacético. A fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose 0,45 µm e degaseificada em banho de ultrassom por 15 minutos. Utilizou-se o fluxo de 1,2 $mL.min^{-1}$, com tempo total de corrida de 10 minutos. A temperatura da coluna foi de 30°C. Foram injetados 50 µL da amostra e empregaram-se para detecção por fluorescência os comprimentos de onda de 230 nm (excitação) e 305 nm (emissão) para o metoprolol, e de 338 nm (excitação) e 425 nm (emissão) para o padrão interno ofloxacino.

4.2.1.7 Validação do método para quantificação de (R,S)-metoprolol em plasma humano

A validação foi realizada através da determinação de especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade, conforme estabelecido pela RE 899 da ANVISA (Brasil, 2003).

4.2.1.7.1 Especificidade

Especificidade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presente de outros componentes da amostra.

Tal parâmetro foi investigado pela análise de, no mínimo, seis amostras de plasma branco para verificação da existência de interferência por parte de componentes endógenos, sendo uma amostra de plasma lipêmico, uma amostra de plasma hemolisado e quatro amostras de plasma normal, obtidas de voluntários sadios e isentas de fármaco e padrão-interno. Interferentes no tempo de retenção do padrão e padrão interno foram aceitos desde que sua resposta representasse no máximo 20% da área do pico correspondente ao limite de quantificação inferior para o padrão e 5% da área do pico do padrão-interno.

4.2.1.7.2 Recuperação

A recuperação é a medida da eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não submetidas ao processo de extração.

Foi determinada comparando-se resultados de análises de amostras de plasma adicionado de padrão de metoprolol e padrão-interno, submetidas ao processo de extração, a resultados de análises de amostras de metoprolol e padrão interno, não submetidas a esse processo, em três diferentes concentrações para o metoprolol (alta: 400 $ng.mL^{-1}$, média: 200 $ng.mL^{-1}$ e baixa: 10 $ng.mL^{-1}$) e seis repetições.

4.2.1.7.3 Limite de Quantificação

Limite de quantificação é a menor concentração de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

O limite de quantificação foi determinado utilizando-se concentrações decrescentes do fármaco, em seis repetições, até o menor nível quantificado. A exatidão deve estar entre ± 20 % do valor nominal da concentração, com coeficiente de variação de, no máximo, 20 %.

4.2.1.7.4 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento (representada pela razão da área do pico do padrão/ área do pico do PI) e a concentração conhecida do analito.

Para avaliar a linearidade da curva de calibração de metoprolol foram utilizadas amostras de plasma padrão em oito concentrações diferentes, de 5, 20, 50, 100, 250 e 500 $ng.mL^{-1}$. Estabeleceu-se correlação linear entre a concentração, considerada variável independente (x) e a relação entre as áreas do pico do metoprolol e do padrão interno (P/PI), considerada variável dependente (y). Os parâmetros da correlação foram estimados através do

método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada pelo valor do coeficiente de correlação linear (r^2), que deve ser superior a 0,98.

4.2.1.7.5 Precisão

A precisão de um método representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. Este parâmetro possibilita medir o erro aleatório e expressá-lo em porcentagem como coeficiente de variação (C.V. %).

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100,$$

onde:
CV (%) = coeficiente de variação
DP = Desvio Padrão
CMD = Concentração média determinada

Esse parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações (alta: 400 $ng.mL^{-1}$, média: 200 $ng.mL^{-1}$ e baixa: 10 $ng.mL^{-1}$). O valor do coeficiente de variação (CV%) não deve ser superior a 15%.

Foram avaliadas a precisão intra-dia, por meio de análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis, e inter-dias, por meio de análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de seis por dia.

4.2.1.7.6 Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. O cálculo da exatidão pode ser efetuado pela relação entre a concentração média

determinada e a concentração teórica correspondente, conforme representado na equação abaixo:

$$Exatidão(\%) = \frac{CMD}{CT} \times 100 ,$$

onde,

CMD= concentração média determinada

CT = concentração teórica

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três diferentes concentrações (alta: 400 $ng.mL^{-1}$, média: 200 $ng.mL^{-1}$ e baixa: 10 $ng.mL^{-1}$). A exatidão deve estar entre ± 15% do valor nominal da concentração.

Foram avaliadas a exatidão intra-dia, por meio de análises realizadas no mesmo dia em réplicas de seis, e inter-dias, por meio de análises realizadas em três dias diferentes em réplicas de seis por dia.

4.2.1.7.7 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (Brasil, 2003c).

Determinou-se a estabilidade das soluções padrão de trabalho utilizadas para preparação diária da curva de calibração, de amostras de plasma mantidas a -20°C, de amostras de plasma submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, além da estabilidade de curta duração (estabilidade de amostras de plasma à temperatura ambiente durante 4 horas) e estabilidade pós-processamento (estabilidade de amostras de plasma processadas e mantidas por 24 horas à temperatura ambiente). Os desvios em

relação a amostras recém-preparadas devem estar entre ± 15% e o coeficiente de variação não deve ser superior a 15%.

A determinação da estabilidade de longa duração excedeu o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra na etapa clínica e análise da última na etapa analítica.

4.2.1.7.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Para determinar este parâmetro foram utilizadas três amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações ((alta: 400 $ng.mL^{-1}$, média: 200 $ng.mL^{-1}$ e baixa: 10 $ng.mL^{-1}$), submetidas às seguintes condições: congelamento a – 20°C por 24 horas, descongelamento e recongelamento por mais 24 horas e assim sucessivamente até completar três ciclos. A concentração do fármaco nas amostras de plasma de controle de qualidade foi determinada nos três ciclos, inclusive no tempo zero (recém-preparadas), correspondente à preparação das amostras de plasma de controle de qualidade e análise das mesmas sem submetê-las ao congelamento.

4.2.1.7.7.2 Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (alta: 400 $ng.mL^{-1}$, média: 200 $ng.mL^{-1}$ e baixa: 10 $ng.mL^{-1}$), submetidas a descongelamento natural e mantidas a temperatura ambiente durante 4 horas. Após este período, as amostras foram analisadas e os resultados comparados com os das amostras no tempo zero (recém-preparadas).

4.2.1.7.7.3 Estabilidade pós-processamento

Este parâmetro avaliou a estabilidade das amostras processadas, contemplando o período de espera no auto-injetor do cromatógrafo. Conjuntos de amostras de controle de qualidade processados foram analisados após 24 horas a 4°C e os resultados comparados com os das amostras no tempo zero (recém-preparadas).

4.2.1.7.7.4 Estabilidade das soluções padrão de trabalho

Para avaliar a estabilidade das soluções padrão, estas foram preparadas e analisadas imediatamente após preparo, mantidas em temperatura ambientes durante 6 horas, e analisadas novamente. A estabilidade das soluções de trabalho de metoprolol e ofloxacino (padrão-interno) mantidas a 4°C foi determinada pela análise diária das mesmas durante as corridas analíticas das amostras de plasma dos voluntários. Os resultados foram comparados com os das soluções-padrão recém-preparadas. Admitiu-se desvios entre ± 15% com coeficiente de variação não superior a 15%.

4.2.1.8 Quantificação de (R,S)-metoprolol nas amostras de plasma humano

As amostras de plasma de voluntários que receberam metoprolol foram analisadas utilizando o processo de purificação e o método cromatográfico descritos nos itens 4.2.1.5 e 4.2.1.6, respectivamente, paralelamente a curva de calibração com seis pontos (5, 20, 50, 100, 250 e 500 $ng.mL^{-1}$) e a amostras de plasma de controle de qualidade em triplicata, e em três concentrações (10, 200 e 400 $ng.mL^{-1}$). As amostras de plasma de controle de qualidade foram distribuídas regularmente ao longo das corridas analíticas.

A validação das corridas analíticas foi realizada por meio da análise das curvas de calibração, obtidas a partir das amostras de plasma padrão da curva de calibração, e das amostras de plasma de controle de qualidade.

Os resultados das amostras de plasma de controle de qualidade serviram de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica.

4.2.2 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico quiral para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano

O método analítico enantioseletivo por cromatografia líquida para quantificação dos enantiômeros do metoprolol foi desenvolvido empregando-se coluna cromatográfica quiral.

Para que a separação quiral aconteça é necessário a formação de diastereoisômeros na superfície da coluna, pois esses estereoisômeros possuem propriedades físico-químicas diferentes. O composto que formar o diastereoisômero mais estável terá um tempo de eluição maior, enquanto aquele menos estável será eluído primeiro. As forças que regem essa interação são fracas e requerem uma otimização cuidadosa por ajuste da fase móvel e de temperatura, a fim de maximizar a seletividade do método.

O efeito da temperatura é importante na separação quiral: baixas temperaturas aumentam o reconhecimento quiral, mas com a desvantagem de que elas podem alterar a cinética da transferência de massa, e também prejudicar a separação por causar alargamento dos picos.

Estão descritos na literatura alguns métodos quirais para a quantificação dos enantiômeros do metoprolol em plasma, por meio de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência. Os principais utilizam a coluna quiral do tipo Chiralcel OD® derivada de carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil, com fase móvel constituída de hexano, etanol e dietilamina, variando suas proporções.

Para o desenvolvimento do metódo foi avaliado o efeito de diferentes fatores, tais como proporção dos solventes orgânicos, pH e fluxo da fase móvel, e temperatura do forno. Todas as condições foram testadas utilizando detecção por fluorescência nos comprimentos de onda de 230 (excitação) e 305 nm (emissão) para o metoprolol. Para as análises foram utilizadas soluções preparadas em água:metanol (90:10), na concentração de 250 $ng.mL^{-1}$ para cada enantiômero do metoprolol.

A partir dos resultados observados o método enantioseletivo foi desenvolvido e validado para quantificação dos enantiômeros do metoprolol em

plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, após extração por precipitação de proteínas utilizando acetonitrila, e ofloxacino como padrão interno (PI).

4.2.2.1 Preparo das soluções estoque padrão e soluções de trabalho padrão dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

Prepararam-se soluções estoque padrão dos enantiômeros do metoprolol na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ em água:metanol (10:90, v/v), cada um. Estas soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em freezer à temperatura de -20ºC.

As soluções de trabalho padrão de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol foram preparadas a partir das respectivas soluções estoque padrão, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com água:metanol (90:10, v/v), conforme descrito no Quadro 6. As soluções de trabalho foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em geladeira à temperatura de 4ºC.

Quadro 6: Preparo das soluções de trabalho padrão de (R)-metoprolol e S metoprolol.

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão	Volume de solução estoque padrão	Volume final	Concentração final
CS1	100 $\mu g.mL^{-1}$	50 μL	100 mL	50 $ng.mL^{-1}$
CS2	100 $\mu g.mL^{-1}$	50 μL	50 mL	100 $ng.mL^{-1}$
CS3	100 $\mu g.mL^{-1}$	50 μL	25 mL	200 $ng.mL^{-1}$
CS4	100 $\mu g.mL^{-1}$	125 μL	25 mL	500 $ng.mL^{-1}$
CS5	100 $\mu g.mL^{-1}$	125 μL	10 mL	1250 $ng.mL^{-1}$
CS6	100 $\mu g.mL^{-1}$	250 μL	10 mL	2500 $ng.mL^{-1}$

4.2.2.2 Preparo de amostras de plasma padrão da curva de calibração dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

As amostras de plasma padrão das curvas de calibração foram preparadas diariamente a partir de soluções de trabalho padrão de 50 $ng.mL^{-1}$, 100 $ng.mL^{-1}$, 200 $ng.mL^{-1}$, 500 $ng.mL^{-1}$, 1250 $ng.mL^{-1}$ e 2500 $ng.mL^{-1}$ para cada enantiômero de metoprolol em água:metanol (90:10, v/v). Tomaram-se alíquotas de 50 µL de solução de trabalho padrão de cada enantiômero de metoprolol e 20 µL de solução-padrão de ofloxacino a 100 $ng.mL^{-1}$ em água:metanol (90:10, v/v). Adicionaram-se 200 µL de plasma branco e as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo vórtex por 30 segundos. O Quadro 7 apresenta as diluições realizadas para obtenção das amostras de plasma padrão da curva de calibração.

Quadro 7: Preparo das amostras de plasma padrão da curva de calibração para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.

Amostra de plasma padrão	Concentração da solução de trabalho padrão	Volume de solução de trabalho padrão	Volume de plasma branco	Concentração final
CC1	50 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	10 $ng.mL^{-1}$
CC2	100 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	20 $ng.mL^{-1}$
CC3	200 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	40 $ng.mL^{-1}$
CC4	500 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	100 $ng.mL^{-1}$
CC5	1250 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	250 $ng.mL^{-1}$
CC6	2500 $ng.mL^{-1}$	50 µL	200 µL	500 $ng.mL^{-1}$

4.2.2.3 Preparo das soluções de trabalho padrão de controle de qualidade para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

As soluções de trabalho padrão de controle de qualidade foram preparadas a partir das soluções estoque padrão dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$, transferindo-se alíquotas adequadas para balões volumétricos e completando-se o volume com água:metanol (90:10, v/v), conforme descrito no Quadro 8.

As soluções obtidas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenada em geladeira à temperatura de 4ºC.

Quadro 8: Preparo das soluções padrão de controle de qualidade (CQ) para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.

Solução de trabalho padrão	Concentração da solução estoque padrão	Volume de solução estoque padrão	Volume final	Concentração final
CQA	100 $\mu g.mL^{-1}$	500 μL	25 mL	2000 $ng.mL^{-1}$
CQM	100 $\mu g.mL^{-1}$	500 μL	50 mL	1000 $ng.mL^{-1}$
CQB	100 $\mu g.mL^{-1}$	500 μL	500 mL	100 $ng.mL^{-1}$

4.2.2.4 Preparo de amostras de plasma de controle de qualidade para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

Para preparação das amostras de plasma de controle de qualidade alto (CQA, 400 $ng.mL^{-1}$), médio (CQM, 200 $ng.mL^{-1}$) e baixo (CQB, 20 $ng.mL^{-1}$) transferiram-se alíquotas de soluções de trabalho padrão de metoprolol em

água:metanol (90:10, v/v), nas concentrações de 100 ng.mL^{-1}, 1000 ng.mL^{-1} ou 2000 ng.mL^{-1}, conforme descrito no Quadro 8, para balões volumétricos de 25 mL. A seguir, adicionou-se lentamente o plasma branco e homogeneizou-se gentilmente para evitar a formação de espuma. Após completar o volume agitou-se vigorosamente para garantir a homogeneização.

Após o preparo, estas soluções foram aliquotadas em frascos de polipropileno de 2 mL e armazenadas em freezer a - 20°C.

Quadro 9: Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.

Amostra de plasma de controle de qualidade	Concentração da solução de trabalho padrão	Volume de solução de trabalho padrão	Volume de plasma branco	Concentração final
CQA	2000 ng.mL^{-1}	5 mL	25 mL	400 ng.mL^{-1}
CQM	1000 ng.mL^{-1}	5 mL	25 mL	200 ng.mL^{-1}
CQB	100 ng.mL^{-1}	5 mL	25 mL	20 ng.mL^{-1}

4.2.2.5 Tratamento das amostras de plasma para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

Para o procedimento de purificação das amostras de plasma humando contendo os enantiômeros do metoprolol foi utilizado o mesmo método desenvolvido para quantificação do (R,S)-metoprolol, descrito no item 4.2.1.4, utilizando precipitação de proteínas com acetonitrila. Ao final do procedimento as amostras foram ressuspendidas em 250 µL de fase móvel para injeção em CLAE.

4.2.2.6 Condições cromatográficas para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano

Para a quantificação dos enantiômeros (S)-metoprolol e (R)-metoprolol empregou-se coluna cromatográfica quiral Chiralcel OD-R com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm.

A fase móvel foi composta por uma mistura de hexano:etanol:dietilamina, na proporção de 90:10:0,1 (v/v). A fase móvel foi degaseificada em banho de ultrassom por 15 minutos. Utilizou-se o fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi de 25°C. Foram injetados 50 µL da amostra e os comprimentos de onda para detecção por fluorescência para o metoprolol foram de 230 nm (excitação) e 305 nm (emissão) e de 338 nm (excitação) e 425 nm (emissão) para o padrão interno ofloxacino.

4.2.2.7 Validação do método enantioseletivo para quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma

A validação foi realizada através da determinação de especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade para cada enantiômero, conforme estabelecido pela RE 899 da ANVISA (Brasil, 2003) e da mesma forma que descrito para a validação do método para quantificação de (R,S)-metoprolol (item 4.2.1.7).

4.2.2.8 Quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol nas amostras de plasma dos voluntários

As amostras de plasma de voluntários que receberam metoprolol foram analisadas utilizando o processo de purificação e o método cromatográfico descritos nos itens 4.2.1.4 e 4.2.2.4, respectivamente. O procedimento

realizado foi o mesmo que para o método descrito para análise de (R,S)-metoprolol, descrito no item 4.2.1.8, com a diferença de que para cada corrida cromatográfica foram incluídas curvas de calibração para cada enantiômero e grupos de amostras de controle de qualidade também para cada enantiômero.

4.2.3 Ensaios de Biodisponibilidade

Foi realizado o ensaio *in vivo* de biodisponibilidade com o objetivo de investigar a influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica na velocidade de absorção do (R,S) metoprolol e de cada um de seus enantiômeros e também sobre as concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol e de (R)-metoprolol e sobre a relação entre estas concentrações (S/R);

Os protocolos dos estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP.

4.2.3.1 Administração do medicamento

Foram administradas as seguintes soluções contendo metoprolol:

- Solução oral contendo 100 mg de tartarato de metoprolol / dose (Tratamento 1);
- Solução oral contendo 50 mg de tartarato de metoprolol / dose (Tratamento 2);
- Solução oral contendo 20 mg de tartarato de metoprolol / dose (Tratamento 3).

Os comprimidos contendo metoprolol foram triturados, pesados e fracionados, de acordo com a fase do estudo, seguindo os tratamentos 1, 2 e 3. As frações foram acondicionados em recipientes e no momento da

administração, para cada voluntário, foram dissolvidas em 25 mL de veículo aquoso edulcorado. As frações dissolvidas foram administradas juntamente com 200 mL de água.

4.2.3.2 Casuística

Foram selecionados 20 voluntários saudáveis de ambos os sexos, sendo 10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, que foram devidamente informados sobre as características da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A idade, altura e peso médio dos voluntários que concluíram a etapa clínica foram 27 anos, 171 cm e 66 kg, respectivamente (Quadro 10).

Todos os voluntários satisfizeram os critérios de inclusão:

- não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal ± 15 %, calculado pela fórmula PI = (H – 100) para homens e PI = 0,9 x (H – 100) para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- não estavam em tratamento com medicamentos;
- voluntárias do sexo feminino não estavam em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

A inclusão dos indivíduos foi baseada também em resultados dos seguintes exames clínicos e laboratoriais, além do eletrocardiograma.

- hemograma completo;
- uréia;

- creatinina;
- fosfatase alcalina;
- glicemia;
- bilirrubina total;
- proteínas totais e albumina;
- transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP);
- ácido úrico;
- colesterol total;
- triglicérides;
- urina tipo I;
- sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C;
- β-HCG para mulheres;
- eletrocardiograma com doze derivações.

Todos os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, foram repetidos no período pós-estudo.

Quadro 10 Características dos voluntários que concluíram a etapa clínica para o estudo clínico

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Altura (cm)	Peso (kg)	D.P.I. (%)
1	M	25	180	82	1,4
2	F	38	157	64	9,0
3	F	25	168	68	4,8
4	M	24	165	60	3,5
5	M	25	170	68	1,4
6	M	28	168	70	1,4
7	M	27	180	80	0,0
8	F	26	170	58	3,5
9	F	30	166	60	0,4
10	F	30	166	58	1,0
11	M	32	173	60	9,2
12	F	31	170	62	0,7
13	M	23	173	70	2,1
14	F	24	168	62	0,6
15	M	21	183	80	2,1
16	M	26	178	75	2,1
17	F	24	170	60	2,1
18	F	31	175	65	1,8
19	F	27	165	55	2,5
20	M	21	178	73	3,5
Média	**...**	26,9	171,15	66,5	2,66
D.P.	**...**	4,04	6,23	7,88	2,44

D.P.I. = desvio do peso ideal; D.P. = desvio padrão

4.2.3.3 Procedimento do ensaio de biodisponibilidade

4.2.3.3.1 Delineamento do estudo

No estudo clínico os voluntários receberam os três tratamentos empregados em sequência (Fase 1, Fase 2 e Fase 3). As soluções de metoprolol foram administradas em três regimes diferentes, que simulam diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir de uma forma farmacêutica.

Durante a Fase 1 do estudo, os voluntários receberam uma dose única de 100 mg de tartarato de metoprolol (Tratamento 1). Na Fase 2 a dose única de 100 mg foi administrada em duas tomadas de 50 mg de tartarato de metoprolol com intervalo de 30 minutos entre elas (Tratamento 2). Finalmente, na Fase 3 os voluntários receberam a dose única de 100 mg de tartarato de metoprolol em cinco tomadas de 20mg a cada 30 minutos (Tratamento 3).

Entre as três fases do estudo houve um período de “wash out” adequado, correspondente a, no mínimo, 10 vezes o valor da meia-vida de eliminação do metoprolol.

4.2.3.3.2 Local, forma de internação dos voluntários e alimentação

As internações dos voluntários selecionados para os estudos clínico aconteceram no período de agosto a setembro de 2012.

Os voluntários do estudo clínico foram internados às 6:30h da manhã de cada fase do ensaio no Hospital Universitário da USP. Todos compareceram em jejum de pelo menos 8 horas. A administração das soluções contendo metoprolol ocorreu a partir das 7:00 horas. Os voluntários permaneceram 4 horas em jejum após a administração do medicamento, totalizando 12 horas de jejum. O tempo de permanência no local do ensaio foi de aproximadamente 9

horas, para coletas até a oitava hora após o início da administração do medicamento.

Durante o período de internação foram oferecidos aos voluntários duas refeições padronizadas (almoço e lanche).

Os voluntários foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas, café e outras bebidas ou alimentos contendo xantinas a partir de 48 horas antes da administração do medicamento em cada uma das fases. Durante o período de internação estas bebidas e alimentos não foram oferecidos. Além disso, foram orientados a não tomarem qualquer medicamento uma semana antes do estudo ou durante sua realização.

4.2.3.3.3 Coleta, processamento e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de 5 mL de sangue em tubo heparinizado a 0:00, 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00 horas após o início da administração do medicamento.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 min e o plasma obtido foi transferido a tubos de polipropileno e congelados a -20°C em congelador até a realização do ensaio para quantificação do metoprolol e seus enantiômeros.

4.2.4.5 Avaliação da Biodisponibilidade

Após a quantificação do metoprolol total e seus enantiômeros nas amostras de plasma provenientes do estudo clínico, a biodisponibilidade foi determinada através da avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de absorção do fármaco (Ritschel, 1992; Shargel, Yu, 1992):

Os parâmetros avaliados foram:

Parâmetros relacionados à velocidade de absorção do fármaco:

- $C_{máx}$: concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração, determinada diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo;
- $T_{máx}$: tempo necessário para $C_{máx}$, determinado diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo.

Parâmetros relacionados à quantidade de fármaco absorvida:

- $ASC_{0\text{-}t}$: área parcial sob a curva "concentração plasmática *versus* tempo" do tempo zero ao tempo da última concentração quantificável, determinada pelo método dos trapezóides;
- $ASC_{0\text{-}inf}$: área total sob a curva "concentração plasmática *versus* tempo" do tempo zero extrapolada ao infinito, determinada pelo método dos trapezóides, do tempo zero ao tempo da última concentração quantificável, e por extrapolação do tempo da última concentração quantificável a infinito, ou seja, $ASC_{0\text{-}t} + C_t/k_{el}$, no qual C_t é a última concentração quantificável experimentalmente e k_{el} é a constante de eliminação da fase terminal.

Parâmetros farmacocinéticos relativos à eliminação:

- $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco, determinada a partir da fórmula:

$$t_{(1/2)el} = \frac{0{,}693}{k_{el}}$$

- k_{el}: constante de velocidade de eliminação do fármaco (β), determinada a partir de equação que define a parte terminal de decaimento plasmático em função do tempo.

  $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco;

  - k_{el}: constante de velocidade de eliminação do fármaco.

4.2.4.6 Analise estatística

As concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros e os parâmetros farmacocinéticos obtidos para os diferentes tratamentos empregados foram comparados utilizando analise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95% (I.C. 95 %). Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software STATISTICA® (StatSoft. Inc., USA).

Foi realizada análise de variância (ANOVA), para os parâmetros farmacocinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{(1/2)}$ e ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros referentes aos três esquemas de administração, seguindo o modelo não compartimental. Foi considerado nível de significância (p) menor que 0,05. Os parâmetros farmacocinéticos foram adicionalmente analisados por teste *post hoc* (método de Scheffé) para discernir diferenças específicas entre os tratamentos empregados.

.

5. RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação de (R,S)-metoprolol em plasma humano

O método desenvolvido para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma apresentou especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos.

5.1.1 Especificidade

O método desenvolvido demonstrou-se específico para o fármaco metoprolol e o padrão interno ofloxacino, obtendo-se boa separação destes entre si e dos componentes do plasma, com tempos de retenção de 8,0 e 4,0 minutos respectivamente (Figura 3 e 4).

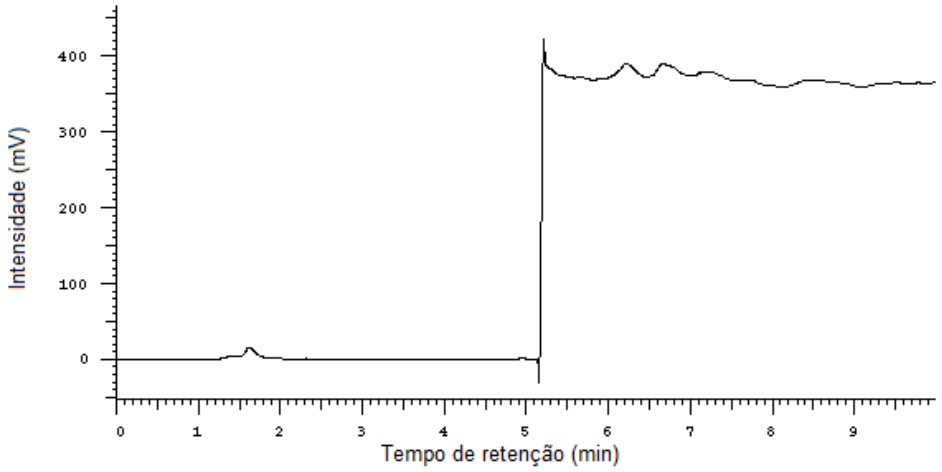

Figura 3: Cromatograma referente a amostra de plasma branco.

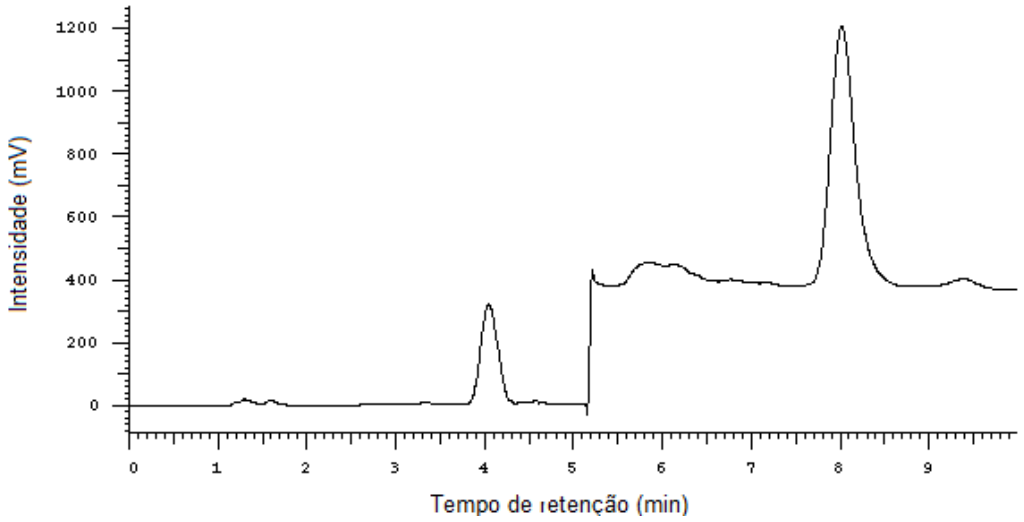

Figura 4: Cromatograma referente a amostra de plasma fortificada com os padrões de metoprolol (8 min) e ofloxacino (4 min).

5.1.2 Recuperação

A recuperação média do processo de purificação utilizado para quantificação de metoprolol em amostras de plasma foi de 71,26% para o metoprolol (analito) com precisão e exatidão dentro dos limites especificados, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela.1 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações

Amostra de plasma CQ	Concentração de Metoprolol	Recuperação
CQB	10 $ng.mL^{-1}$	67,30 %
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	70,40 %
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	76,10 %

5.1.3 Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método foi 5 ng.mL^{-1}, com precisão e exatidão de 10,13 % e 88,81 %, respectivamente.

5.1.4 Linearidade

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 5 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}. A Figura 5 e a Tabela 2 apresentam a curva de calibração e seus parâmetros, respectivamente.

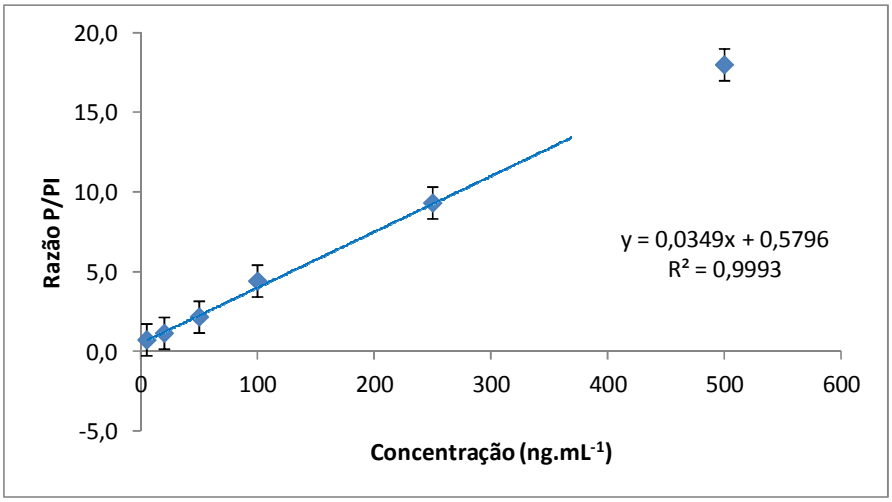

Figura.5 Curva de calibração do metoprolol total em plasma na faixa de concentração de 5 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}. Cada valor representa uma média de seis determinações

Tabela 2 Parâmetros relativos a curva de calibração do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 5 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$.

Parâmetro	Valor
Inclinação (a)	0,0349
Intercepto (b)	0,5796
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9993

5.1.5 Precisão

A precisão variou entre 3,76 a 5,71% para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 3,76 a 6,06 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Precisão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	10 $ng.mL^{-1}$	5,71	6,06
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	3,76	4,49
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	3,78	3,76

5.1.6 Exatidão

A exatidão variou entre 90,28 a 95,67 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 91,29 a 96,68 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação de metoprolol total em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Exatidão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	90,28	91,29
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	95,67	96,68
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	94,02	95,02

5.1.7 Estabilidade

5.1.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de plasma de controle de qualidade mantiveram-se estáveis por até três ciclos de congelamento a - 20°C e descongelamento à temperatura ambiente, como observado nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 1			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	10	9,55	1,84	95,55	9,35	2,06	93,51	0,19
CQM	200	198,96	6,42	99,48	196,08	5,93	98,04	11,63
CQA	400	381,14	5,91	95,28	377,11	5,82	94,28	11,93

Tabela 6 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 2			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	10	9,55	1,84	95,55	9,18	9,72	91,81	0,89
CQM	200	198,96	6,42	99,48	199,88	1,72	99,94	3,45
CQA	400	381,14	5,91	95,28	403,43	15,28	100,86	1,63

Tabela 7 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0 horas)			Ciclo 3			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	10	9,55	1,84	95,55	9,18	4,09	91,83	0,38
CQM	200	198,96	6,42	99,48	181,75	5,76	90,87	0,47
CQA	400	381,14	5,91	95,28	389,27	0,66	97,32	2,56

5.1.7.2 Estabilidade de curta duração

As amostras de plasma de controle de qualidade apresentaram estabilidade adequada para a condução do estudo como observado na Tabela 8.

Tabela 8 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	10	9,55	1,84	95,55	9,32	5,89	93,23	0,55
CQM	200	198,96	6,42	99,48	189,58	5,39	94,79	10,21
CQA	400	381,14	5,91	95,28	393,92	3,07	98,48	2,09

5.1.7.3 Estabilidade pós-processamento

Os resultados obtidos para a estabilidade pós-processamento são apresentados na Tabela 9, podendo-se observar resultados satisfatórios para a finalidade do estudo.

Tabela 9 Estabilidade do metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	10	9,55	1,84	95,55	9,30	10,08	93,00	0,94
CQM	200	198,96	6,42	99,48	201,86	2,06	100,93	4,15
CQA	400	381,14	5,91	95,28	409,47	15,46	102,37	3,28

5.1.7.4 Estabilidade das soluções padrão de trabalho

As soluções padrão de trabalho de metoprolol mantiveram-se estáveis após 6 horas de seu preparo e durante toda a etapa analítica. Os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados, com desvio médio de 2,46 % para o metoprolol, após 6 horas de seu preparo.

5.2 Desenvolvimento e validação de método quiral para quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em plasma humano

O método enantioseletivo desenvolvido para a quantificação quiral do metoprolol em amostras de plasma apresentou boa separação para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, como observado na Figura 6. O método apresentou especificidade, recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos (Brasil, 2003c).

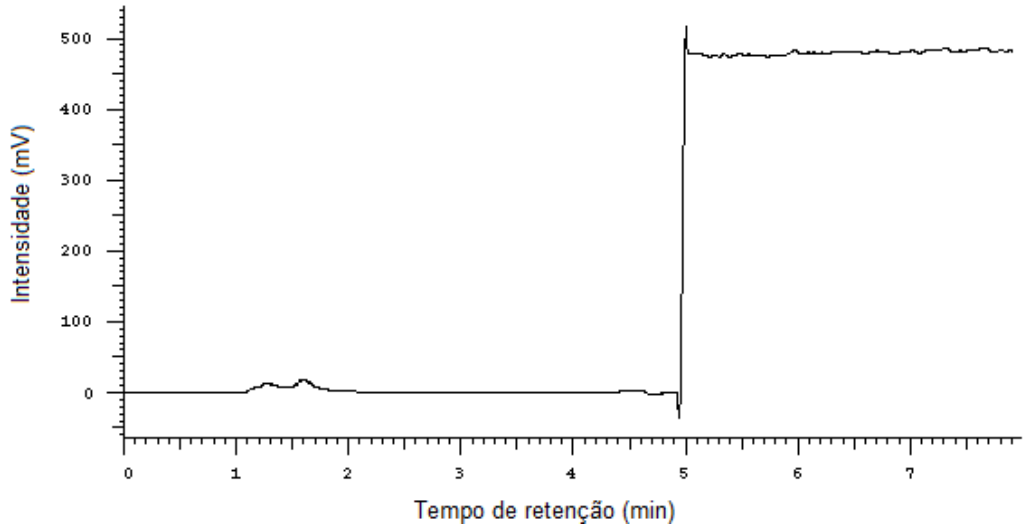

Figura 6: Cromatograma referente a amostra de plasma branco, obtida por método quiral.

5.2.1 Especificidade

O método desenvolvido demonstrou-se específico para ambos os enantiômeros do fármaco metoprolol, obtendo-se boa separação destes entre si e dos componentes do plasma, com tempos de retenção de 6,0 minutos para (R)-metoprolol e 8,0 minutos para (S)-metoprolol (Figura 7).

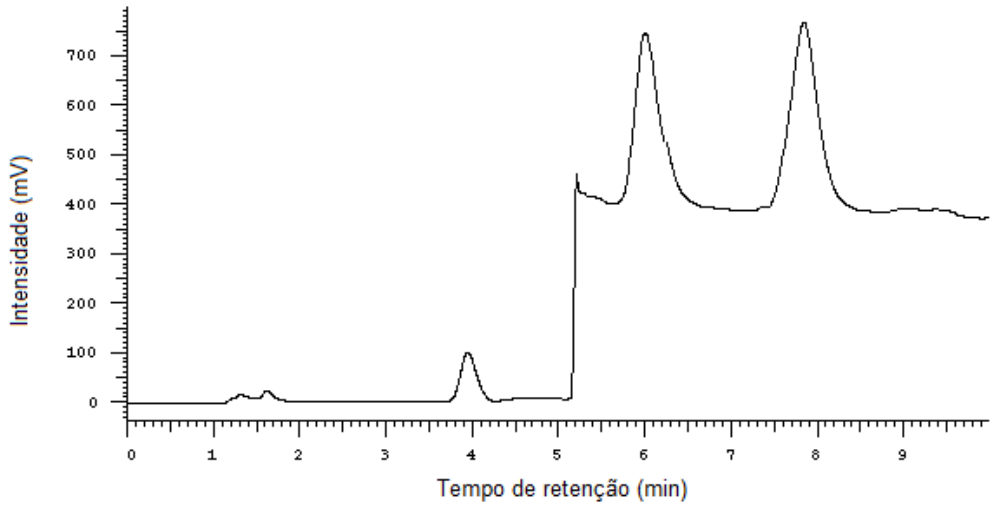

Figura 7 Cromatograma referente a separação quiral, mostrando (R)-metoprolol em 6,0 minutos e (S)-metoprolol em 8,0 minutos.

5.2.2 Recuperação

A recuperação média do processo de purificação utilizado para quantificação de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em amostras de plasma foi de 66,33 % e 66,00% respectivamente, com precisão e exatidão dentro dos limites especificados, conforme detalhado nas Tabelas 10 e 11.

Tabela.10 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para o enantiômero (R)-metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Recuperação
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	62,3 %
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	66,2 %
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	70,5 %

Tabela.11 Recuperação média de processo de purificação das amostras de plasma para o enantiômero (S)-metoprolol. Cada valor representa a média de seis determinações.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Recuperação
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	63,0 %
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	64,4 %
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	70,6 %

5.2.3 Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método foi 10 ng.mL^{-1} para ambos os enantiômeros, com precisão de 11,80 % e 11,54 % e exatidão de 74,88 % e 77,66% para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente.

5.2.4 Linearidade

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 10 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}, para ambos os enantiômeros. As Figura 8 e 9 apresentam as curvas de calibração para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente, e as Tabelas 12 e 13 mostram os parâmetros obtidos a partir das curvas para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, respectivamente.

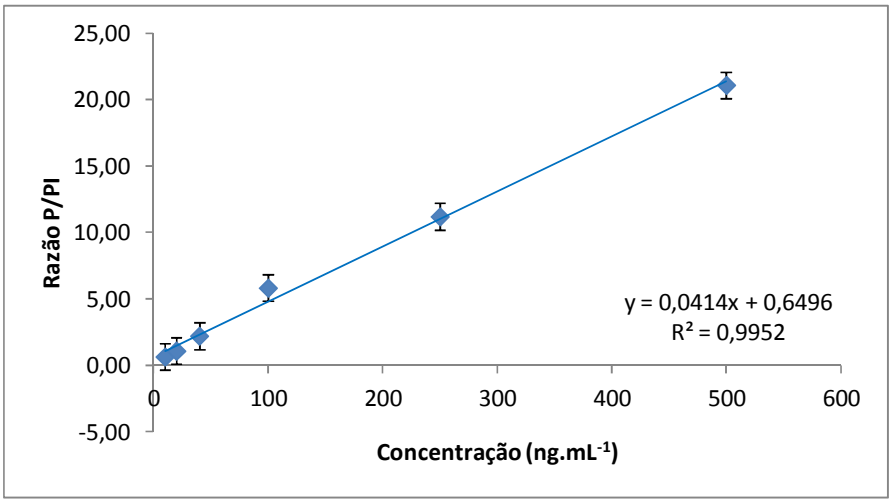

Figura 8 Curva de calibração para o (R)-metoprolol em plasma na faixa de concentração de 10 ng.mL^{-1} a 500 ng.mL^{-1}. Cada valor representa uma média de seis determinações

Tabela 12 Parâmetros relativos a curva de calibração do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 10 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$.

Parâmetro	Valor
Inclinação (a)	0,0414
Intercepto (b)	0,6496
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9952

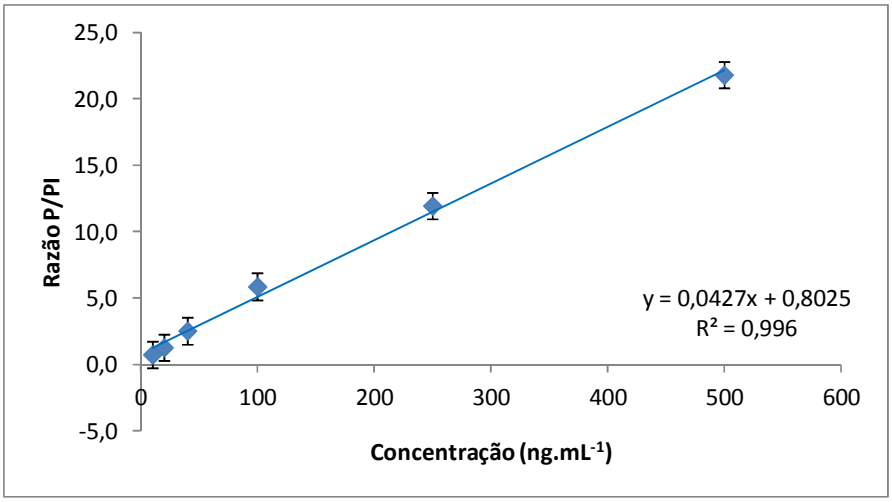

Figura 9 Curva de calibração para o (S)-metoprolol em plasma na faixa de concentração de 10 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$. Cada valor representa uma média de seis determinações

Tabela 13 Parâmetros relativos a curva de calibração do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência na faixa de concentração de 10 $ng.mL^{-1}$ a 500 $ng.mL^{-1}$.

Parâmetro	Valor
Inclinação (a)	0,0427
Intercepto (b)	0,8025
Coeficiente de determinação (r^2)	0,996

5.2.5 Precisão

Para o enantiômero (R)-metoprolol a precisão variou entre 5,6 % a 8,69 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 5,99 % a 8,33 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 14, já para o enantiômero (S)-metoprolol a precisão variou entre 4,75 % a 9,01 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 5,25 % a 10,07 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 14 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Precisão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	8,69	8,33
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	6,72	6,85
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	5,6	5,99

Tabela 15 Precisão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de determinações para precisão intra-dia e para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Precisão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	9,01	10,07
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	7,18	7,37
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	4,75	5,25

5.2.6 Exatidão

Para o enantiômero (R)-metoprolol a exatidão variou entre 84,62 % a 86,69 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 84,63 % a 86,70 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 16, já para o enantiômero (S)-metoprolol a exatidão variou entre 82,68 % a 84,84 % para amostras analisadas no mesmo dia (intra-dia) e entre 82,63 % a 84,85 % para amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias), conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 16 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Exatidão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	84,90	84,91
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	86,69	86,70
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	84,62	84,63

Tabela 17 Exatidão intra-dia e inter-dias do método bioanalítico para quantificação do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. Cada valor representa a média de seis determinações para exatidão intra-dia e dezoito determinações para inter-dias.

Amostra de plasma CQ	Concentração de metoprolol	Exatidão	
		Intra-dias	Inter-dias
CQB	20 $ng.mL^{-1}$	82,68	82,63
CQM	200 $ng.mL^{-1}$	84,84	84,85
CQA	400 $ng.mL^{-1}$	84,33	84,33

5.2.7 Estabilidade

5.2.7.1 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras de plasma de controle de qualidade de ambos os enantiômero mantiveram-se estáveis por até três ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento à temperatura ambiente, e são observados nas tabelas 18, 19 e 20, e 21, 22 e 23 respectivamente.

Tabela 18 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 1			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	20,86	10,93	104,35	21,89	3,80	109,45	3,80
CQM	200	177,09	14,27	88,54	175,75	8,81	87,87	10,48
CQA	400	335,48	9,77	83,87	345,60	0,80	86,40	2,77

Tabela 19 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 2			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	20,86	10,93	104,35	20,44	3,37	102,20	0,69
CQM	200	177,09	14,27	88,54	183,84	4,27	91,92	7,85
CQA	400	335,48	9,77	83,87	348,72	3,98	87,18	3,90

Tabela 20 Estabilidade do enantiômero (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0 horas)			Ciclo 3			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	20,86	10,93	104,35	18,09	7,86	90,45	7,89
CQM	200	177,09	14,27	88,54	173,21	5,64	86,60	5,64
CQA	400	335,48	9,77	83,87	327,88	7,23	81,97	7,23

Tabela 21 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após um ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 1). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 1			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	16,25	3,95	81,26	15,10	2,75	75,53	0,42
CQM	200	187,97	4,40	93,98	176,36	11,93	88,18	1,04
CQA	400	366,16	3,26	91,54	358,66	0,81	89,66	2,92

Tabela 22 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após dois ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 2). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal ($ng.mL^{-1}$)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Ciclo 2			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	16,25	3,95	81,26	15,74	4,96	78,74	0,78
CQM	200	187,97	4,40	93,98	180,84	14,75	90,42	6,67
CQA	400	366,16	3,26	91,54	362,38	6,18	90,60	2,41

Tabela 23 Estabilidade do enantiômero (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o preparo (tempo 0h) e após três ciclo de congelamento/descongelamento (ciclo 3). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0 horas)			Ciclo 3			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	16,25	3,95	81,26	16,25	10.06	81,28	1,63
CQM	200	187,97	4,40	93,98	176,75	5,83	88,37	10,30
CQA	400	366,16	3,26	91,54	339,97	7,35	84,99	5,00

5.2.7.2 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração para os enatiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol foram determinadas mantendo-se amostras de plasma de controle de qualidade descongeladas à temperatura ambiente por 4 horas. Após este período as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados obtidos foram comparados aos das amostras recém-preparadas (tempo 0h), admitiram-se desvios entre $\pm$ 15% (Tabela 24 e 25 respectivamente).

Tabela 24 Estabilidade do (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	20,86	10,93	104,35	16,58	7,57	82,92	1,26
CQM	200	177,09	14,27	88,54	176,96	10,60	88,48	8,76
CQA	400	335,48	9,77	83,87	327,27	6,17	81,82	0,21

Tabela 25 Estabilidade do (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação imediatamente após o preparo (tempo 0h) e submetidas ao processo de purificação 4 horas após o descongelamento (tempo 4h). Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	16,25	3,95	81,26	16,77	3,39	83,88	10,09
CQM	200	187,97	4,40	93,98	171,95	8,76	85,97	5,06
CQA	400	366,16	3,26	91,54	330,40	4,26	82,60	0,57

5.2.7.3 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento de ambos os enantiômeros foi determinada por meio da comparação dos resultados de análises de amostras de controle de qualidade submetidas ao processo de purificação e mantidas à temperatura de 4ºC antes do início da análise cromatográfica por 24 horas (tempo 24h) com os resultados de amostras submetidas à análise cromatográfica imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h). Admitiram-se desvios entre ± 15%. Tabelas 26 e 27 para os resultados obtidos para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente.

Tabela 26 Estabilidade do (R)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	20,86	10,93	104,35	16,43	10,74	82,19	1,77
CQM	200	177,09	14,27	88,54	179,53	5,39	89,77	9,68
CQA	400	335,48	9,77	83,87	325,59	4,51	81,40	4,69

Tabela 27 Estabilidade do (S)-metoprolol em amostras de plasma de controle de qualidade analisadas imediatamente após o processo de purificação (tempo 0h) e 24h após o processo de purificação. Cada resultado representa a média de três determinações.

Amostra de plasma de CQ	Conc. nominal (ng/mL)	Amostras recém-preparadas (Tempo 0h)			Estabilidade de curta (Tempo 4h)			Desvio (%)
		Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (ng/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	
CQB	20	16,25	3,95	81,26	16,01	2,62	80,09	0,42
CQM	200	187,97	4,40	93,98	174,67	4,82	87,33	8,41
CQA	400	366,16	3,26	91,54	342,51	3,39	85,63	10.60

5.2.7.4 Estabilidade das soluções padrão

As soluções padrão de trabalho dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol mantiveram-se estáveis após 6 horas de seu preparo e durante toda a etapa analítica. Os resultados obtidos apresentaram-se dentro dos limites especificados, com desvio médio de 3,24 e 2,96 % respectivamente, após 6 horas de seu preparo.

5.3 Quantificação de (R,S)-metoprolol em amostras de plasma humano

As amostras de plasma provenientes do estudo clínico do metoprolol foram analisadas nas condições determinadas na validação do método.

5.3.1 Concentrações plasmáticas médias de (R,S)-metoprolol

As concentrações plasmáticas médias de (R,S)-metoprolol após administração oral do fármaco estão apresentadas nas tabelas a seguir. Na Fase 1 foi administrada a dose total de metoprolol em uma única tomada (Tabela 26), na Fase 2 a dose total de metoprolol foi particionada em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas (Tabela 27), e para a Fase 3 houve a partição da dose de metoprolol em 5 tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas (tabela 28).

Tabela 26 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado

Concentrações plasmáticas de metoprolol ($ng.mL^{-1}$) - Fase 1			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0	0
0,50	147,93	21,93	14,82
1,00	213,94	17,03	7,96
1,50	210,42	40,18	19,10
2,00	169,12	31,72	18,76
2,50	132,76	19,52	14,70
3,00	108,87	15,29	14,04
3,50	87,02	13,16	15,13
4,00	68,53	12,40	18,10
5,00	46,62	10,23	21,94
6,00	24,11	8,61	35,71
7,00	8,34	2,44	29,27
8,00	NQ	0,0	0,0

Tabela 27 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de metoprolol ($ng.mL^{-1}$) - Fase 2			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	75,29	9,66	12,83
1,00	150,99	20,00	13,25
1,50	229,18	29,63	12,93
2,00	220,91	37,32	16,89
2,50	167,53	27,25	16,27
3,00	130,59	16,84	12,89
3,50	111,18	11,31	10,17
4,00	95,15	10,67	11,21
5,00	71,41	11,31	15,83
6,00	51,91	7,43	14,31
7,00	26,36	5,06	19,21
8,00	NQ	0,0	0,0

Tabela 28 Concentrações plasmáticas médias do metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de metoprolol ($ng.mL^{-1}$) - Fase 3			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	24,61	5,36	21,79
1,00	68,40	8,65	12,64
1,50	104,81	15,41	14,71
2,00	145,07	39,89	27,50
2,50	193,78	19,57	10,10
3,00	165,41	21,78	13,17
3,50	135,23	22,29	16,48
4,00	105,98	11,75	11,09
5,00	85,91	11,16	12,99
6,00	65,29	8,50	13,01
7,00	43,33	7,46	17,22
8,00	18,68	6,83	36,59

5.3.2 Curvas médias de decaimento plasmático *versus* tempo para (R,S)-metoprolol

As curvas médias de decaimento plasmático referentes as Fases 1, 2 e 3 estão apresentadas nas figuras 10, 11 e 12 respectivamente.

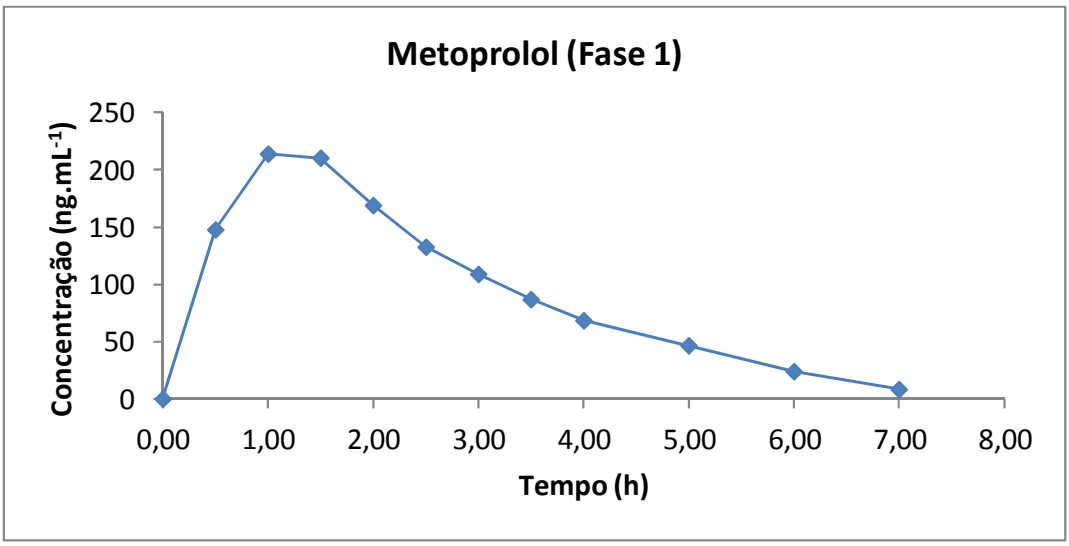

Figura 10 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios.

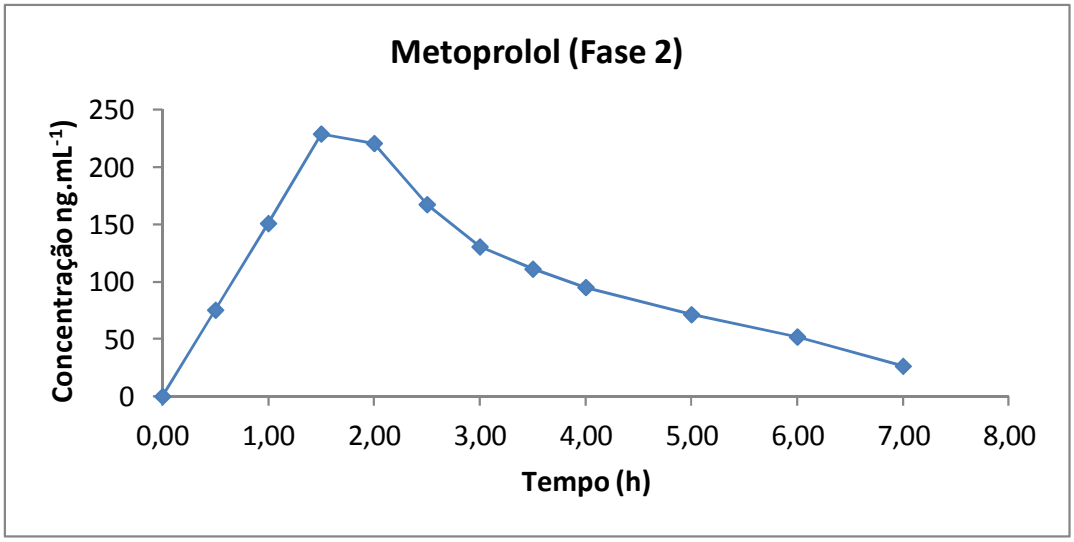

Figura 11 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

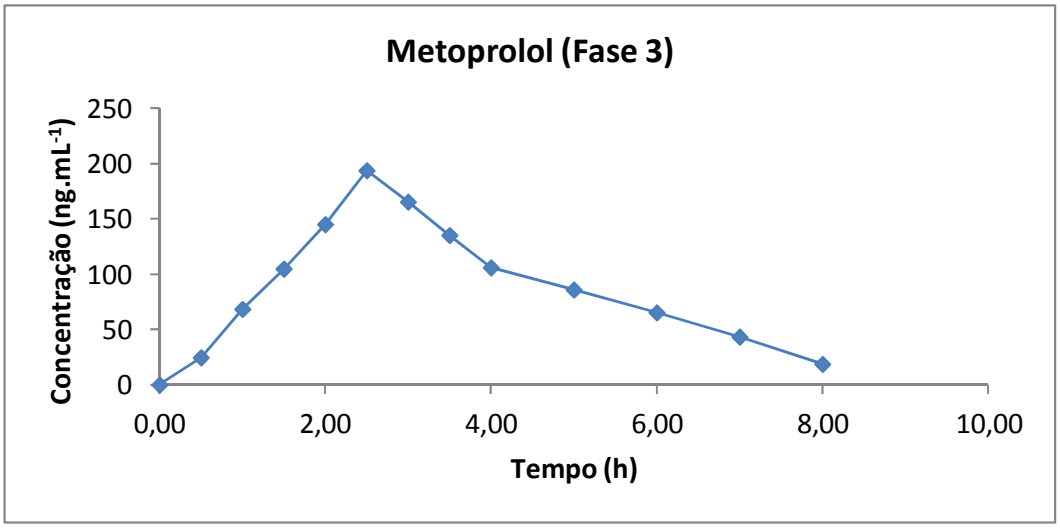

Figura 12 Curva média de concentração plasmática do metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

5.3.3 Parâmetros farmacocinéticos para o (R,S)-metoprolol

As Tabelas 29, 30 e 31 apresentam os parâmetros farmacocinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{(1/2)el}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} e a relação percentual entre os valores de ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} para o metoprolol total, Fase 1, 2 e 3 respectivamente.

Tabela 29 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

metoprolol (FASE 1)						
Voluntários	**C_{max} (ng.mL^{-1})**	**t_{max} (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} (ngxh.mL^{-1})**	**$ASC_{0-\infty}$ (ngxh.mL^{-1})**	**%**
1	218,84	1,00	0,94	690,07	700,80	98,47
2	207,61	1,50	0,83	687,02	693,93	99,00
3	276,89	1,50	1,21	700,10	720,41	97,18
4	294,76	1,50	0,91	764,84	772,52	99,01
5	236,38	1,00	0,92	694,52	704,63	98,57
6	225,19	1,00	1,53	577,19	609,03	94,77
7	232,14	1,00	1,21	607,19	625,62	97,06
8	242,68	1,50	0,76	793,17	800,62	99,07
9	218,69	1,00	1,03	697,85	712,78	97,91
10	222,60	1,00	1,13	601,15	616,64	97,49
11	226,76	1,00	0,89	669,57	677,99	98,76
12	210,47	1,50	0,81	673,59	680,67	98,96
13	259,49	1,50	1,02	659,22	672,99	97,95
14	280,49	1,50	1,03	764,59	778,59	98,20
15	214,63	1,00	0,80	592,17	597,46	99,12
16	216,00	1,00	0,96	543,89	552,28	98,48
17	239,04	1,00	1,10	618,62	631,61	97,94
18	216,36	1,00	0,99	699,61	714,40	97,93
19	200,83	1,00	1,00	649,86	664,00	97,87
20	216,56	1,00	0,96	577,31	585,88	98,54
Média	**232,82**	**1,18**	**1,00**	**663,08**	**675,64**	**98,11**
D.P	**25,97**	**0,24**	**0,18**	**67,68**	**66,58**	**1,00**
C.V. (%)	**11,15**	**20,82**	**17,70**	**10,21**	**9,85**	**1,02**

Tabela 30 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

metoprolol (FASE 2)						
Voluntários	**C_{max} ($ng.mL^{-1}$)**	**t_{max} (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ngxh.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ngxh.mL^{-1}$)**	**%**
1	232,86	1,50	1,51	766,99	823,21	93,17
2	286,39	1,50	1,90	894,76	917,84	97,49
3	212,57	1,50	1,65	720,45	742,50	97,03
4	203,26	1,50	1,72	707,47	717,10	98,66
5	254,17	2,00	1,37	791,41	809,67	97,75
6	236,53	2,00	1,89	690,71	711,06	97,14
7	265,63	2,00	1,51	738,59	750,58	98,40
8	260,23	1,50	1,97	811,10	828,56	97,89
9	260,47	1,50	1,73	833,47	846,27	98,49
10	288,12	2,00	1,56	805,36	826,35	97,46
11	268,71	1,50	1,32	795,25	807,65	98,46
12	217,46	1,50	1,48	730,56	744,49	98,13
13	252,76	1,50	1,51	710,29	733,31	96,86
14	241,72	1,50	1,63	662,21	682,61	97,01
15	235,06	1,50	1,56	714,99	756,52	94,51
16	232,86	2,00	1,69	748,59	755,56	99,08
17	287,14	2,00	1,30	828,92	836,69	99,07
18	241,51	1,50	1,74	765,49	790,32	96,86
19	241,39	1,50	1,83	791,40	808,40	97,90
20	235,84	2,00	1,70	840,69	849,79	98,93
Média	**247,73**	**1,68**	**1,63**	**767,43**	**786,92**	**97,51**
D.P	**24,00**	**0,24**	**0,19**	**59,08**	**58,27**	**1,47**
C.V. (%)	**9,69**	**14,61**	**11,64**	**7,70**	**7,40**	**1,50**

Tabela 31 Parâmetros farmacocinéticos para o metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

metoprolol (FASE 3)						
Voluntários	**C_{max} ($ng.mL^{-1}$)**	**t_{max} (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ngxh.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ngxh.mL^{-1}$)**	**%**
1	167,47	2,50	1,82	601,72	633,42	95,00
2	210,34	2,50	1,77	694,51	719,00	96,59
3	208,47	2,50	2,14	730,13	803,74	90,84
4	197,42	2,50	2,09	644,49	712,70	90,43
5	198,19	2,50	2,03	682,19	731,36	93,28
6	207,30	2,00	2,27	689,91	761,82	90,56
7	211,88	2,00	3,32	713,70	814,76	87,60
8	215,09	2,50	2,02	715,86	744,15	96,20
9	190,87	2,50	2,27	704,88	733,41	96,11
10	226,61	2,50	2,12	737,63	822,11	89,72
11	207,45	2,50	2,17	692,89	765,33	90,53
12	213,00	2,50	2,27	757,47	821,50	92,21
13	200,88	2,50	2,48	704,77	810,24	86,98
14	204,13	2,50	2,50	706,84	766,05	92,27
15	182,76	2,50	2,72	666,69	743,94	89,62
16	183,82	2,50	2,88	691,99	763,10	90,68
17	221,98	2,00	3,00	658,73	723,46	91,05
18	196,23	2,50	2,03	716,72	737,98	97,12
19	182,88	2,50	2,99	766,86	859,52	89,22
20	197,67	2,50	2,54	762,11	874,27	87,17
Média	**201,22**	**2,43**	**2,37**	**702,01**	**767,09**	**91,66**
D.P	**14,56**	**0,18**	**0,42**	**40,27**	**56,62**	**3,14**
C.V. (%)	**7,24**	**7,55**	**17,84**	**5,74**	**7,38**	**3,43**

5.4 Quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em amostras de plasma humano

As amostras de plasma provenientes dos estudo clínico do metoprolol foram processadas e analisadas por dois métodos bianalíticos, um para a quantificação do fármaco total, utilizando método convencional por CLAE, e outro utilizando método enantioseletivo, também utilizando CLAE, nas condições determinadas na validação do método. Aseguir são observados os dados obtidos para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.

5.4.1 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

As concentrações plasmáticas médias obtidas para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, após administração das soluções, estão apresentados nas tabelas a seguir. Na Fase 1 do estudo clínico a dose única de metoprolol foi administrada em uma única tomada (Tabelas 32 e 33), na Fase 2 a dose total de metoprolol foi particionada em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas (Tabelas 34 e 35), e para a Fase 3 houve a partição da dose de metoprolol em 5 tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas (Tabelas 36 e 37).

Tabela 32 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 1			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0	0
0,50	111,50	1,73	1,55
1,00	153,59	13,02	8,48
1,50	137,38	1,98	1,44
2,00	105,12	1,38	1,31
2,50	95,42	2,29	2,40
3,00	83,43	1,99	2,39
3,50	65,82	2,16	3,28
4,00	49,23	2,24	4,56
5,00	31,87	1,52	4,76
6,00	19,42	1,83	9,44
7,00	NQ	NQ	NQ
8,00	NQ	NQ	NQ

Tabela 33 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 1			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0	0
0,50	96,91	8,67	8,94
1,00	122,31	8,02	6,55
1,50	109,23	10,25	9,38
2,00	97,34	8,16	8,38
2,50	77,94	3,97	5,10
3,00	69,16	5,45	7,87
3,50	58,86	5,80	9,85
4,00	46,23	5,21	11,27
5,00	30,36	2,02	6,66
6,00	17,46	2,32	13,31
7,00	NQ	NQ	NQ
8,00	NQ	NQ	NQ

Tabela 34 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 2			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	56,69	1,76	3,11
1,00	91,95	1,53	1,67
1,50	153,31	19,71	12,86
2,00	147,06	14,47	9,84
2,50	108,31	1,79	1,66
3,00	87,40	2,01	2,30
3,50	79,65	1,58	1,98
4,00	69,18	2,02	2,91
5,00	51,12	1,63	3,18
6,00	32,50	1,44	4,42
7,00	18,49	1,61	8,69
8,00	NQ	NQ	NQ

Tabela 35 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 2			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	52,06	2,67	5,12
1,00	91,02	9,67	10,63
1,50	143,60	21,52	14,99
2,00	125,10	8,38	6,69
2,50	100,53	6,09	6,06
3,00	74,44	6,32	8,49
3,50	66,57	5,13	7,70
4,00	60,21	4,00	6,65
5,00	43,39	6,46	14,89
6,00	31,42	3,13	9,96
7,00	17,53	2,78	15,84
8,00	NQ	NQ	NQ

Tabela 36 Concentrações plasmáticas médias de (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 3			
Tempo (h)	**Média**	**DP**	**CV%**
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	12,21	1,59	13,03
1,00	40,40	1,55	3,84
1,50	61,81	1,56	2,52
2,00	63,74	1,75	2,74
2,50	114,23	1,69	1,48
3,00	103,05	1,54	1,49
3,50	72,84	1,51	2,07
4,00	61,45	1,95	3,17
5,00	41,68	1,48	3,55
6,00	32,93	1,83	5,56
7,00	18,93	1,98	10,45
8,00	NQ	NQ	NQ

Tabela 37 Concentrações plasmáticas médias de (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; NQ = não quantificado.

Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol(ng.mL^{-1}) - Fase 3			
Tempo (h)	***Média***	***DP***	***CV%***
0,00	0,00	0,00	0,00
0,50	11,57	1,91	16,54
1,00	38,50	3,57	9,28
1,50	56,37	3,62	6,42
2,00	60,73	5,27	8,68
2,50	106,58	7,70	7,23
3,00	94,26	10,39	11,02
3,50	80,35	6,78	8,44
4,00	67,44	5,72	8,48
5,00	45,78	3,19	6,96
6,00	35,62	4,44	12,46
7,00	22,60	2,76	12,19
8,00	NQ	NQ	NQ

5.4.2 Curvas médias de decaimento plasmático *versus* tempo para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

As curvas médias de decaimento plasmático referentes as Fases 1, 2 e 3 estão apresentadas nas figuras 13, 15 e 17 para (R)-metoprolol e 14, 16 e 18 para (S)-metoprolol.

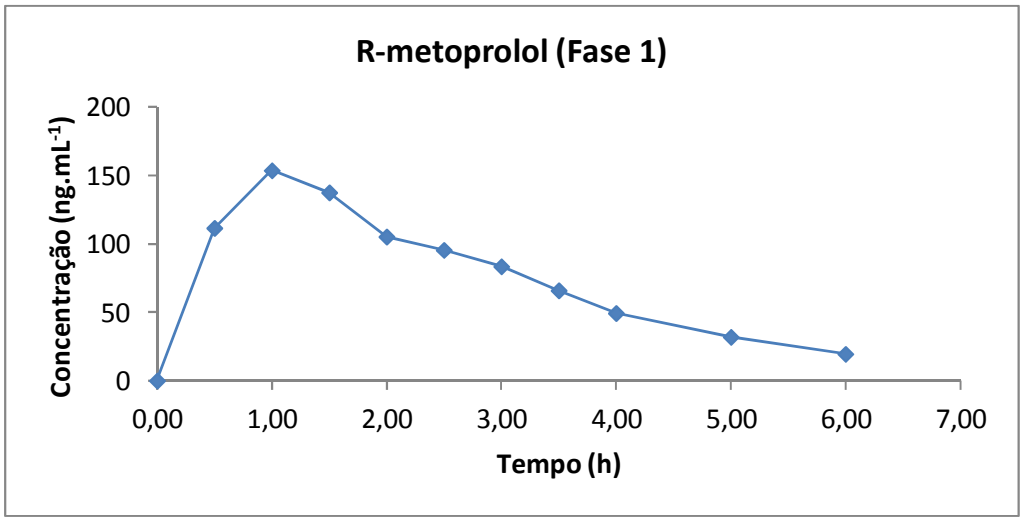

Figura 13 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios.

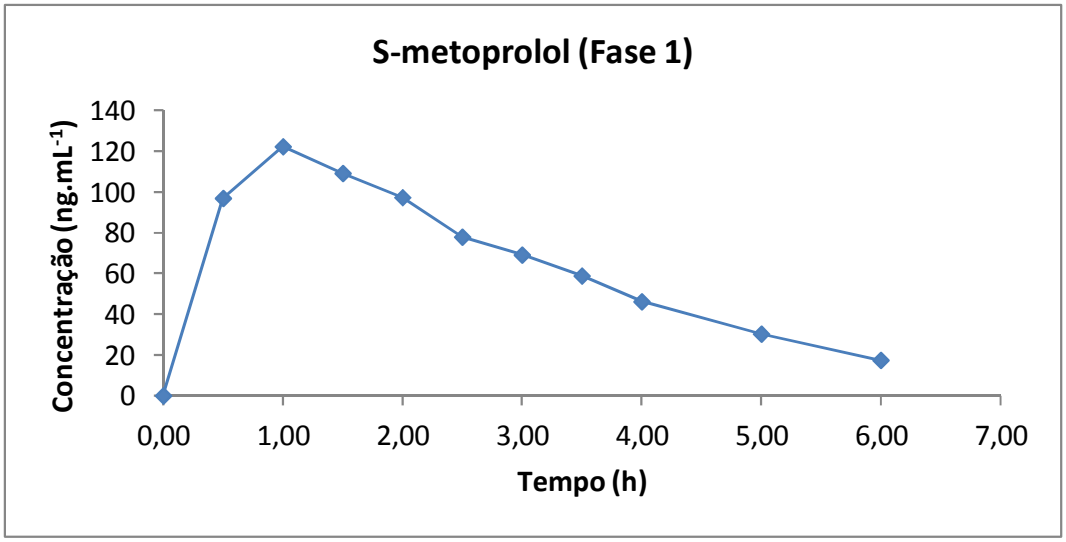

Figura 14 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios.

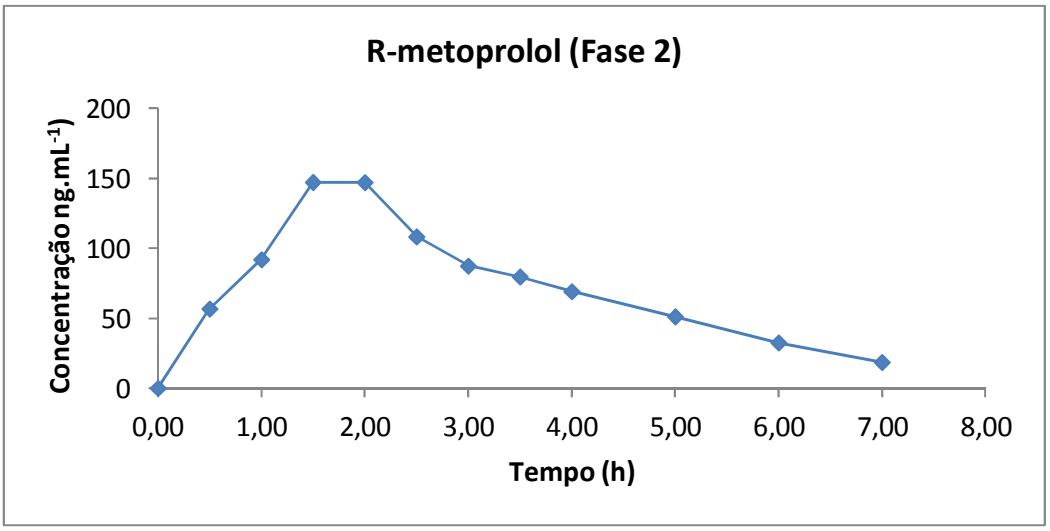

Figura 15 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

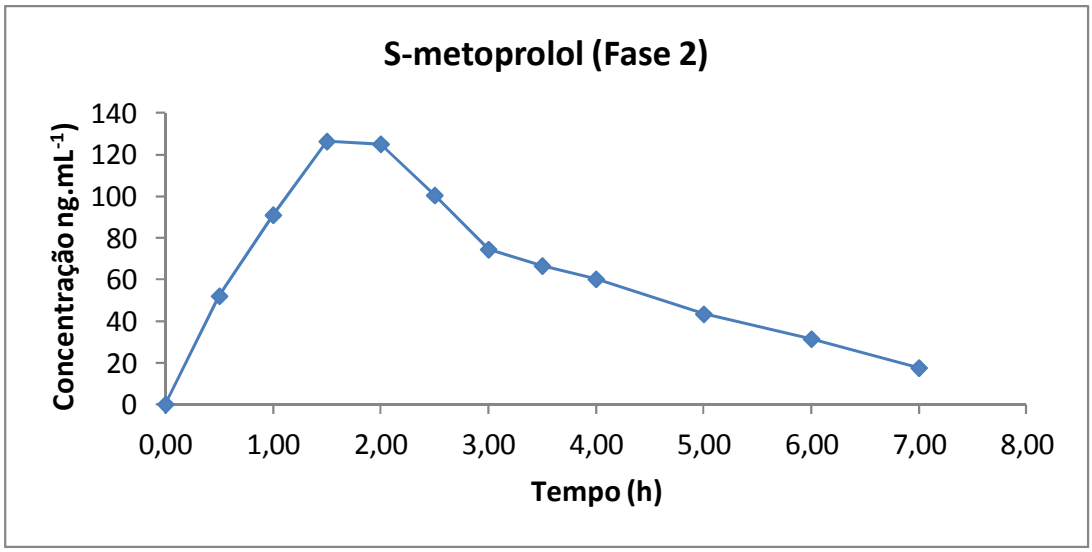

Figura 16 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

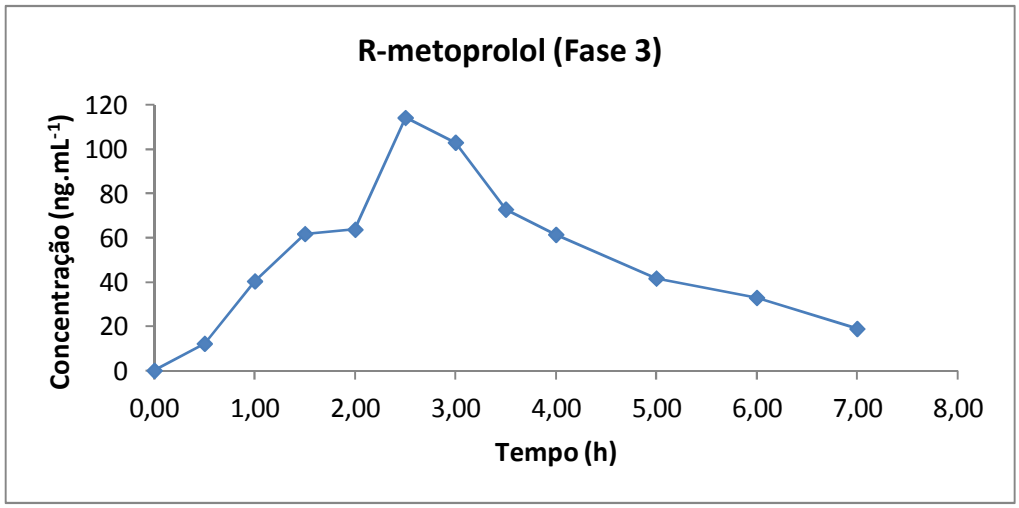

Figura 17 Curva média de concentração plasmática de (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

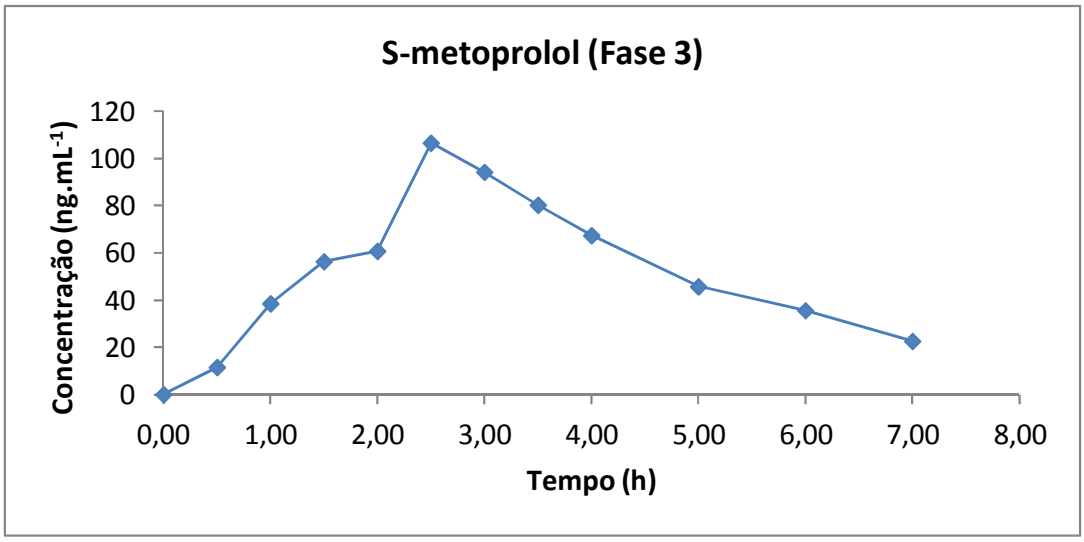

Figura 18 Curva média de concentração plasmática de (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

5.4.3 Parâmetros farmacocinéticos para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol

As Tabelas 38, 40 e 42 apresentam os parâmetros farmacocinéticos $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{(1/2)el}$, ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} e a relação percentual entre os valores de ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} para o enantiômeros (R)-metoprolol, Fase 1, 2 e 3 respectivamente. As Tabelas 39, 41 e 43 apresentam os mesmos parâmetros farmacocinéticos citados acima para o enantiômeros (R)-metoprolol, Fase 1, 2 e 3 respectivamente.

Tabela 38 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(R)- metoprolol (FASE 1)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ng.h.mL^{-1}$)**	**%**
1	147,72	1,00	0,93	469,41	470,94	99,67
2	144,88	1,00	0,82	458,14	460,54	99,48
3	144,71	1,00	0,70	454,08	456,65	99,44
4	151,61	1,00	0,94	472,89	476,11	99,32
5	167,59	1,00	1,02	489,27	493,26	99,19
6	160,88	1,00	0,88	478,52	481,32	99,42
7	143,54	1,00	0,81	456,85	459,83	99,35
8	141,74	1,00	0,78	455,78	458,15	99,48
9	157,89	1,00	0,92	474,51	477,68	99,34
10	145,14	1,00	0,84	456,69	457,91	99,73
11	177,03	1,00	1,04	496,78	502,69	98,82
12	146,49	1,00	0,94	472,55	478,11	98,84
13	143,53	1,00	0,68	450,74	452,68	99,57
14	164,41	1,00	0,93	487,56	491,20	99,26
15	180,58	1,00	1,04	506,04	512,48	98,74
16	177,67	1,00	0,93	495,67	499,14	99,30
17	145,14	1,00	0,83	467,74	470,98	99,31
18	143,37	1,00	0,94	471,40	474,89	99,27
19	146,49	1,00	0,52	445,08	445,73	99,85
20	143,53	1,00	0,68	445,85	447,95	99,53
Média	**153,70**	**1,00**	**0,86**	**470,28**	**473,41**	**99,35**
D.P	**13,03**	**0,00**	**0,14**	**17,75**	**18,96**	**0,29**
C.V. (%)	**8,48**	**0,00**	**15,73**	**3,78**	**4,00**	**0,29**

Tabela 39 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(S)- metoprolol (FASE 1)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ngxh.mL^{-1}$)**	**%**
1	124,620	1,000	1,003	405,245	408,791	99,132
2	120,349	1,000	0,772	408,952	412,615	99,112
3	119,998	1,000	0,867	395,009	396,427	99,643
4	123,431	1,000	0,991	382,391	390,018	98,044
5	134,707	1,000	1,022	421,269	427,401	98,565
6	120,768	1,500	1,142	403,093	405,941	99,298
7	118,601	1,500	1,019	405,873	414,572	97,902
8	120,269	1,500	1,065	423,474	431,408	98,161
9	130,818	1,000	0,824	398,732	402,640	99,030
10	130,568	1,000	0,680	394,229	395,766	99,611
11	125,587	1,000	1,026	410,091	418,823	97,915
12	118,510	1,000	0,722	396,368	399,203	99,290
13	119,822	1,000	0,886	393,406	396,864	99,129
14	125,109	1,000	1,149	394,346	406,482	97,014
15	136,862	1,000	1,179	430,665	440,414	97,786
16	123,594	1,500	1,330	418,371	426,734	98,040
17	119,808	1,500	1,048	408,583	417,793	97,796
18	122,944	1,500	1,155	434,691	446,102	97,442
19	130,571	1,000	0,528	389,351	401,602	96,949
20	129,606	1,000	0,615	385,612	399,804	96,450
Média	**124,84**	**1,16**	**0,95**	**404,97**	**412,14**	**98,27**
D.P	**5,70**	**0,24**	**0,21**	**15,08**	**16,13**	**0,94**
C.V. (%)	**4,56**	**20,62**	**22,63**	**3,72**	**3,91**	**0,96**

Tabela 40 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(R)- metoprolol (FASE 2)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ng.h.mL^{-1}$)**	**%**
1	158,42	1,50	1,55	522,40	531,29	98,33
2	149,78	1,50	1,56	503,57	510,47	98,65
3	149,55	1,50	1,66	506,34	513,06	98,69
4	154,13	1,50	1,58	517,46	525,73	98,43
5	175,49	1,50	1,69	543,96	559,36	97,25
6	156,83	1,50	1,46	522,35	536,06	97,44
7	146,75	1,50	1,57	501,30	511,56	97,99
8	149,22	2,00	1,54	505,29	509,46	99,18
9	155,50	1,50	1,63	522,89	534,32	97,86
10	140,19	1,50	1,54	500,43	506,70	98,76
11	173,97	1,50	1,66	551,61	566,36	97,40
12	161,77	1,50	1,54	519,03	529,28	98,06
13	133,73	1,50	1,59	488,38	494,70	98,72
14	176,99	1,50	1,64	553,41	565,37	97,89
15	190,71	1,50	1,72	576,99	596,94	96,66
16	176,99	1,50	1,52	544,28	558,91	97,38
17	136,10	2,00	1,53	500,44	511,36	97,87
18	166,75	2,00	1,64	537,63	548,93	97,94
19	131,49	2,00	1,48	477,60	481,72	99,14
20	134,13	2,00	1,40	479,38	485,76	98,69
Média	**155,92**	**1,63**	**1,58**	**518,74**	**528,87**	**98,12**
D.P	**16,83**	**0,22**	**0,08**	**26,22**	**29,92**	**0,68**
C.V. (%)	**10,79**	**13,67**	**5,06**	**5,06**	**5,66**	**0,69**

Tabela 41 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(S)- metoprolol (FASE 2)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ng.h.mL^{-1}$)**	**%**
1	135,771	1,500	1,515	442,408	449,074	98,516
2	156,625	1,500	1,796	479,351	482,401	99,368
3	128,879	2,000	1,748	450,867	454,876	99,119
4	125,309	1,500	1,693	450,558	492,918	91,406
5	168,709	1,500	1,890	503,175	515,819	97,549
6	163,314	1,500	1,755	472,060	476,226	99,125
7	151,356	1,500	1,311	463,484	470,518	98,505
8	144,598	1,500	2,126	479,246	485,578	98,696
9	139,661	2,000	1,576	454,454	494,208	91,956
10	121,754	2,000	1,505	435,556	445,016	97,874
11	144,488	1,500	1,597	456,208	466,470	97,800
12	145,201	1,500	1,708	460,201	462,763	99,446
13	127,993	2,000	1,760	449,065	455,566	98,573
14	125,540	1,500	1,679	464,420	507,863	91,446
15	184,092	1,500	1,895	515,908	528,763	97,569
16	187,102	1,500	1,909	500,019	510,182	98,008
17	148,190	1,500	1,312	464,781	473,003	98,262
18	163,358	1,500	2,340	500,587	515,603	97,088
19	136,971	2,000	1,531	443,634	479,971	92,429
20	120,662	2,000	1,453	427,924	434,270	98,539
Média	**146,52**	**1,66**	**1,71**	**466,92**	**481,68**	**96,99**
D.P	**20,03**	**0,24**	**0,26**	**24,16**	**25,97**	**2,83**
C.V. (%)	**13,67**	**14,40**	**14,91**	**5,17**	**5,39**	**2,91**

Tabela 42 Parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(R)- metoprolol (FASE 3)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ng.h.mL^{-1}$)**	**%**
1	114,77	2,50	1,83	380,18	402,90	94,36
2	112,40	2,50	1,73	369,40	387,50	95,33
3	113,35	2,50	1,75	369,93	385,99	95,84
4	114,95	2,50	1,77	379,35	400,78	94,65
5	116,28	2,50	1,86	391,09	417,59	93,65
6	114,77	2,50	1,81	380,71	403,04	94,46
7	113,25	2,50	1,69	372,58	388,72	95,85
8	113,56	2,50	1,74	372,17	389,48	95,56
9	113,74	2,50	1,74	378,78	399,44	94,83
10	113,35	2,50	1,72	368,02	384,23	95,78
11	116,44	2,50	1,86	392,61	419,46	93,60
12	114,50	2,50	1,80	381,98	404,13	94,52
13	112,18	2,50	1,55	358,44	370,60	96,72
14	116,24	2,50	1,90	388,73	416,14	93,41
15	117,32	2,50	1,95	402,00	433,86	92,66
16	116,30	2,50	1,87	392,20	418,14	93,79
17	114,63	2,50	1,80	384,28	406,26	94,59
18	114,93	2,50	1,79	383,39	402,77	95,19
19	112,06	2,50	1,67	359,72	373,41	96,33
20	111,00	2,50	1,47	354,36	366,58	96,67
Média	**114,30**	**2,50**	**1,77**	**378,00**	**398,55**	**94,89**
D.P	**1,69**	**0,00**	**0,11**	**12,47**	**17,76**	**1,13**
C.V. (%)	**1,48**	**0,00**	**6,40**	**3,30**	**4,46**	**1,19**

Tabela 43 Parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios. DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

(S)- metoprolol (FASE 3)						
Voluntários	**$C_{máx}$ ($ng.mL^{-1}$)**	**$T_{máx}$ (h)**	**$T_{(1/2)\beta}$ (h)**	**ASC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)**	**$ASC_{0-\infty}$ ($ng.h.mL^{-1}$)**	**%**
1	97,452	2,500	1,827	349,961	372,681	93,904
2	119,919	2,500	2,055	425,528	457,165	93,080
3	108,422	3,000	2,036	379,406	407,163	93,183
4	111,284	2,500	1,582	386,298	401,817	96,138
5	102,072	2,500	1,972	393,525	423,230	92,981
6	108,405	2,500	2,575	379,387	412,729	91,922
7	118,175	2,500	2,148	381,770	400,221	95,390
8	105,864	2,500	1,576	384,186	408,612	94,022
9	103,646	2,500	1,767	365,560	377,347	96,876
10	96,820	2,500	1,732	383,030	402,584	95,143
11	99,550	2,500	1,803	356,175	379,420	93,873
12	118,161	2,500	1,883	405,739	427,246	94,966
13	108,115	3,000	2,074	375,664	399,710	93,984
14	112,844	2,500	1,744	394,908	414,493	95,275
15	103,772	2,500	2,059	404,943	439,649	92,106
16	109,095	2,500	2,613	387,813	426,593	90,909
17	118,516	2,500	2,082	383,166	399,811	95,837
18	108,003	2,500	1,626	396,253	427,195	92,757
19	101,964	2,500	1,566	355,017	363,171	97,755
20	96,068	2,500	1,951	376,315	396,881	94,818
Média	**107,93**	**2,55**	**1,94**	**384,98**	**408,69**	**94,26**
D.P	**7,25**	**0,16**	**0,30**	**16,88**	**22,29**	**1,78**
C.V. (%)	**6,72**	**6,18**	**15,42**	**4,38**	**5,45**	**1,89**

5.5 Análise comparativa dos parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros

Os perfis médios de concentração plasmática em função do tempo obtidos para o fármaco (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros, a partir dos três diferentes regimes de tratamento empregados, são apresentados nas Figuras 19, 20 e 21. A Tabela 44 mostra as razões entre os enantiômeros (R)-metoprolol e S-metropolol para os parâmetros farmacocinétidos $C_{máx}$ e ASC_{0-t}.

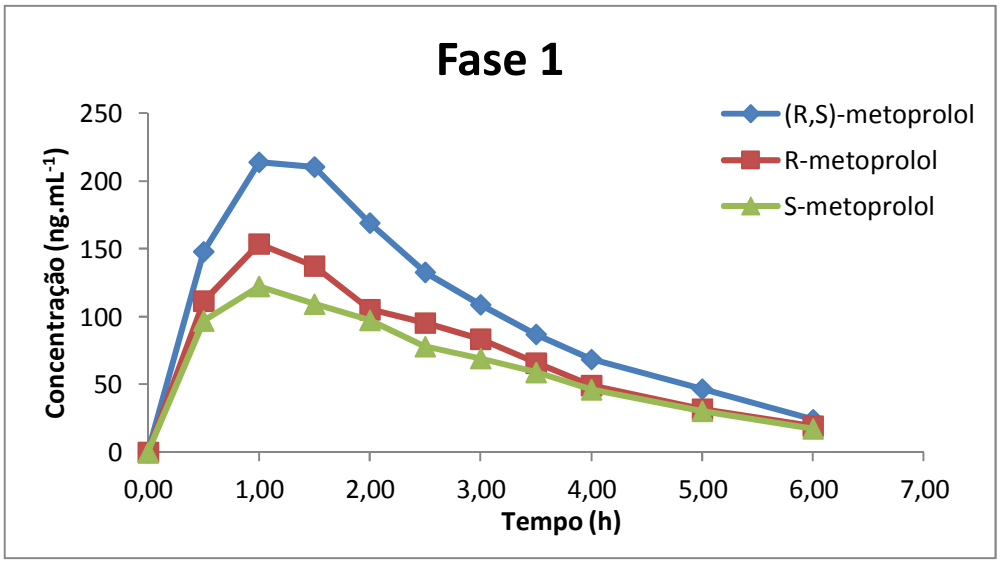

Figura 19 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros na Fase 1 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco a 20 voluntários sadios.

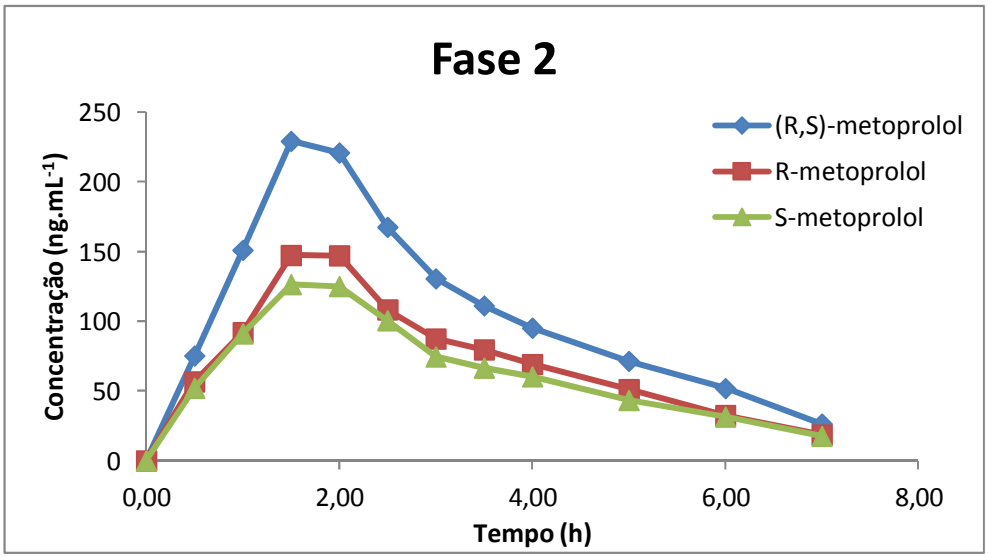

Figura 20 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros na Fase 2 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em duas tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

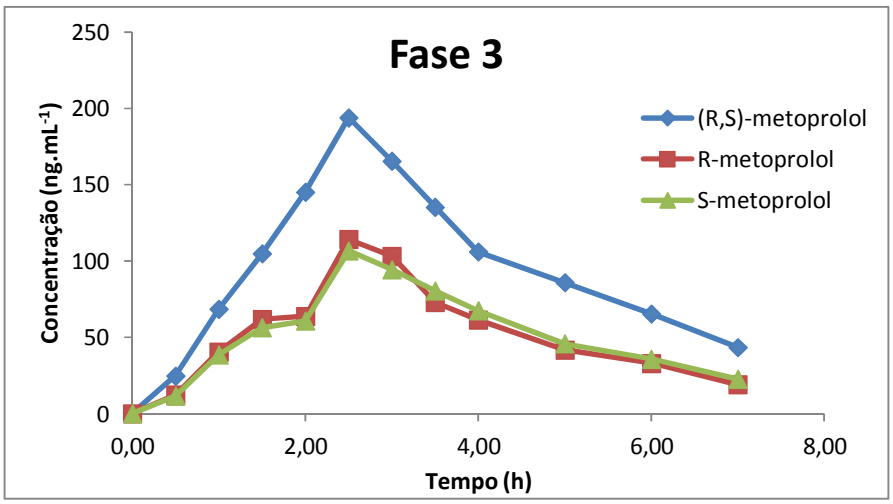

Figura 21 Curva média de concentração plasmática em função do tempo para (R,S)-metoprolol e seus enantiômeros na Fase 3 do estudo clínico, após administração de dose única do fármaco, em cinco tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, a 20 voluntários sadios.

Tabela 44 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos médios de ASC_{0-t} e $C_{máx}$ para os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol.

	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})			$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
	F 1	**F 2**	**F 3**	**F 1**	**F 2**	**F 3**
(R,S)-metoprolol	663,08	767,43	702,01	232,82	247,73	201,22
(R)-metoprolol	470,28	518,74	378,00	153,70	155,92	114,30
(S)-metoprolol	404,97	466,92	384,98	124,84	146,52	107,93
Razão R/S	1,16	1,11	0,98	1,23	1,06	1,06
%	16,1	11,1	1,8	23,1	6,4	5,9

5.6 Análise estatística

Os resultados da análise de variância (ANOVA) com análise *post hoc* para os parâmetros farmacocinéticos de Cmax, Tmax, t(1/2) e ASC_{0-t} para o (R,S)-metoprolol e os enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol são mostrados nas Tabelas 45, 47 e 49 respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados.

As Tabelas 46, 48 e 50 monstram os dados de intervalo de confiança para (R,S)-metoprolol, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados. As Figuras 22, 23 e 24 apresentam os gráficos de $C_{máx}$ em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico e o gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para (R,S)-metoprolol, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados, com intervalo de confiança de 95%.

As Tabelas 51 e 53 mostram os resultados da análise de variância (ANOVA) com análise *post hoc* para os parâmetros farmacocinéticos de Cmax, Tmax, t(1/2) e ASC_{0-t} para as razões de (R,S)-metoprolol sobra (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados.

Nas Tabelas 52 e 54 são apresentados os dados de intervalo de confiança para as razões de (R,S)-metoprolol sobra (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados. As Figuras 25 e 26 mostram os gráficos de Cmax em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico e o gráfico de ASC em função do tratamento empregado aos voluntários no estudo clínico, para as razões de (R,S)-metoprolol sobra (R)-metoprolol e (S)-metoprolol, respectivamente, para os três diferentes regimes de tratamento empregados, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 45 Parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes.

	$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})	$T_{máx}$ (h)	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})
Tramento 1: tomada única de 100 mg			
Média	232,82	1,18	663,08
DP	25,97	0,24	67,68
CV%	11,15	20,82	10,21
Tramento 2: duas tomadas de 50 mg			
Média	247,73	1,68	767,43
DP	24,00	0,24	59,08
CV%	9,69	14,61	7,70
Tramento 3: três tomadas de 20 mg			
Média	201,22	2,43	702,01
DP	14,56	0,18	40,27
CV%	7,24	7,55	5,74
Análise de variância (ANOVA): valores de p, usando método de Scheffé*			
Tratamentos 1 e 2	0,111391	0,000000	0,000002
Tratamentos 1 e 3	0,000158	0,000000	0,105012
Tratamentos 2 e 3	0,000000	0,000000	0,002588
Análise *post hoc*	2,1 > 3	3>2>1	1,3<2

*Diferenças significativas p<0,05

Tabela 46 Intervalo de confiança (IC 95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos para o (R,S)-metoprolol, considerando o regime de tratamento.

Tratamento	Diferenças	IC
$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	14,9128	-2,6349 a 32,4604
Tratamento 1 e 3	-31,5988	-49,1464 a -14,0512
Tratamento 2 e 3	-46,5116	-64,0592 a -28,9639
ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	104,3575	59,179 a 149,5363
Tratamento 1 e 3	38,9277	-6,251 a 84,1065
Tratamento 2 e 3	-65,4297	-110,609 a -20,2509

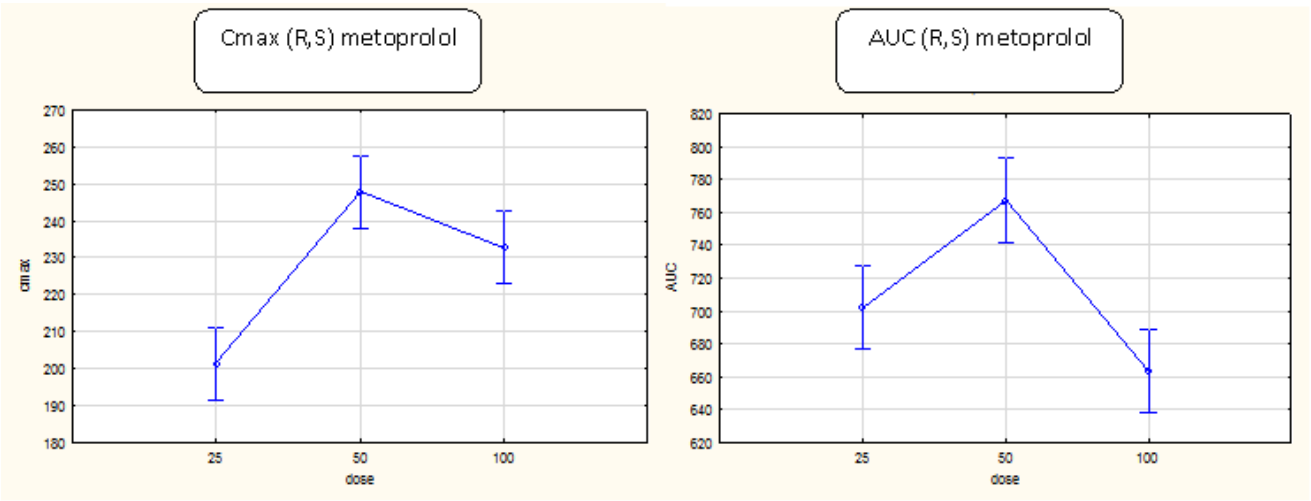

Figura 22 Gráfico de $C_{máx}$ em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (direita), para (R,S) metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95.

Tabela 47 Parâmetros farmacocinéticos de (R)-metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes.

	$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})	$T_{máx}$ (h)	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})
Tramento 1: tomada única de 100 mg			
Média	153,70	1,00	470,28
DP	13,03	0,00	17,75
CV%	8,48	0,00	3,78
Tramento 2: duas tomadas de 50 mg			
Média	155,92	1,63	518,74
DP	16,83	0,22	26,22
CV%	10,79	13,67	5,06
Tramento 3: três tomadas de 20 mg			
Média	114,30	2,50	378,00
DP	1,69	0,00	12,47
CV%	1,48	0,00	3,30
Análise de variância (ANOVA): valores de p, usando método de Scheffé*			
Tratamentos 1 e 2	0,849696	0,000000	0,000000
Tratamentos 1 e 3	0,000000	0,000000	0,000000
Tratamentos 2 e 3	0,000000	0,000000	0,000000
Análise *post hoc*	1,2>3	3>2>1	2>1>3

*Diferenças significativas p<0,05

Tabela 48 Intervalo de confiança (IC 95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos para o (R)-metoprolol, considerando o regime de tratamento.

Tratamento	Diferenças	IC
$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	2,2281	-7,5702 a 12,0264
Tratamento 1 e 3	-39,3947	-49,1930 a -29,5964
Tratamento 2 e 3	-41,6228	-51,4211 a -31,8245
ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	48,460	32,841 a 64,079
Tratamento 1 e 3	-92,281	-107,900 a -76,662
Tratamento 2 e 3	-140,741	-156,360 a -125,122

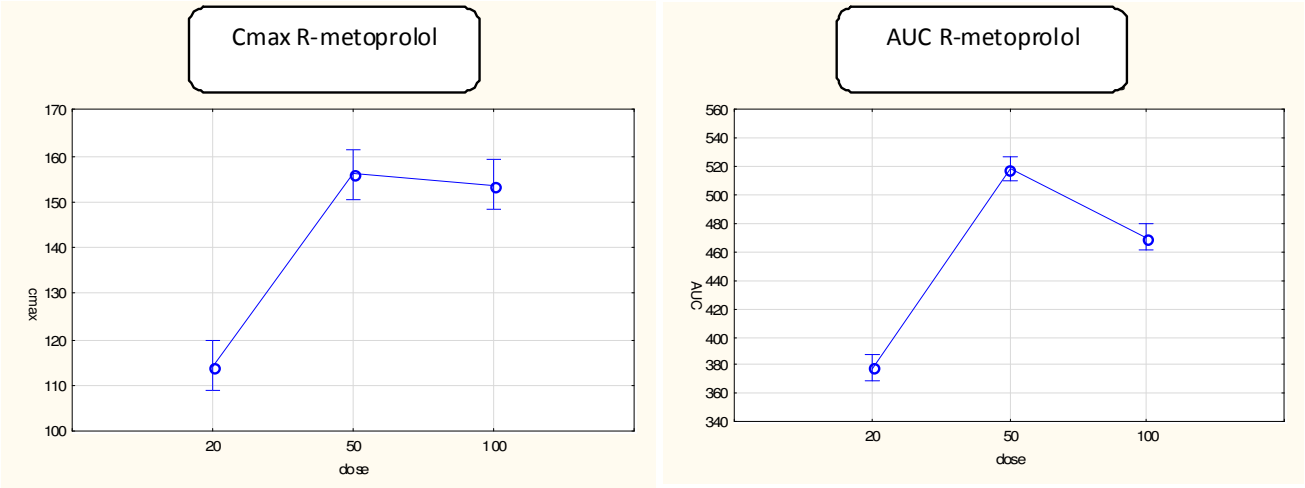

Figura 23 Gráfico de $C_{máx}$ em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (direita), para (R)-metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95.

Tabela 49 Parâmetros farmacocinéticos de (S)-metoprolol após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes.

	$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})	$T_{máx}$ (h)	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})
Tramento 1: tomada única de 100 mg			
Média	124,84	1,16	404,97
DP	5,70	0,24	15,08
CV%	4,56	20,62	3,72
Tramento 2: duas tomadas de 50 mg			
Média	146,52	1,66	466,92
DP	20,03	0,24	24,16
CV%	13,67	14,40	5,17
Tramento 3: três tomadas de 20 mg			
Média	107,93	2,55	384,98
DP	7,25	0,16	16,88
CV%	6,72	6,18	4,38
Análise de variância (ANOVA): valores de p, usando método de Scheffé*			
Tratamentos 1 e 2	0,000010	0,000000	0,000000
Tratamentos 1 e 3	0,000246	0,000000	0,003416
Tratamentos 2 e 3	0,000000	0,000000	0,000000
Análise *post hoc*	2>1>3	3>2>1	2>1>3

*Diferenças significativas $p<0,05$

Tabela 50 Intervalo de confiança (IC 95%) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos para o (S)-metoprolol, considerando o regime de tratamento.

Tratamento	Diferenças	IC
$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	21,1516	11,1838 a 31,1194
Tratamento 1 e 3	-17,4197	-27,3875 a -7,4519
Tratamento 2 e 3	-38,5713	-48,5391 a -28,6035
ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	60,7079	45,2841 a 76,1316
Tratamento 1 e 3	-21,7553	-37,1790 a -6,3316
Tratamento 2 e 3	-82,4631	-97,8868 a -67,0394

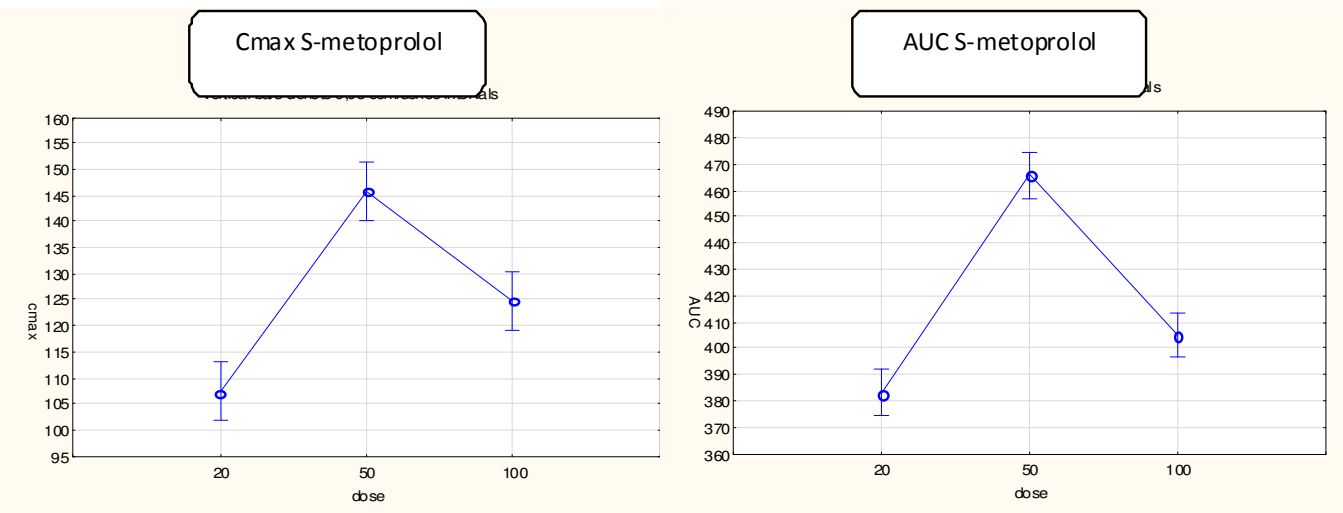

Figura 24 Gráfico de $C_{máx}$ em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (direita), para (S)-metoprolol, com intervalo de confiança de 0,95.

Tabela 51 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes.

	$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})	$T_{máx}$ (h)	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})
Tramento 1: tomada única de 100 mg			
Média	1,53	1,18	663,08
DP	0,21	0,24	67,68
CV%	13,93	20,82	10,21
Tramento 2: duas tomadas de 50 mg			
Média	1,61	1,05	767,43
DP	0,26	0,19	59,08
CV%	16,36	18,37	7,70
Tramento 3: três tomadas de 20 mg			
Média	1,76	0,95	702,01
DP	0,13	0,08	40,27
CV%	7,66	8,74	5,74
Análise de variância (ANOVA): valores de p, usando método de Scheffé*			
Tratamentos 1 e 2	0,444755	0,095306	0,335379
Tratamentos 1 e 3	0,003380	0,003747	0,000000
Tratamentos 2 e 3	0,085429	0,435044	0,000000
Análise *post hoc*	1 < 2 < 3	1 > 2 > 3	1,2 < 3

*Diferenças significativas p<0,05

Tabela 52 Intervalo de confiança (IC 95%) para as diferenças entre as razões dos parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), considerando o regime de tratamento.

Tratamento	Diferenças	IC
$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	0,085280	-0,081911 a 0,252471 -
Tratamento 1 e 3	0,236066	0,068875 a 0,403256
Tratamento 2 e 3	0,150786	0,016405 a 0,317977
ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	0,072793	-0,049801 a 0,195386
Tratamento 1 e 3	0,448678	0,326084 a 0,571271
Tratamento 2 e 3	0,375885	0,253291 a 0,498478

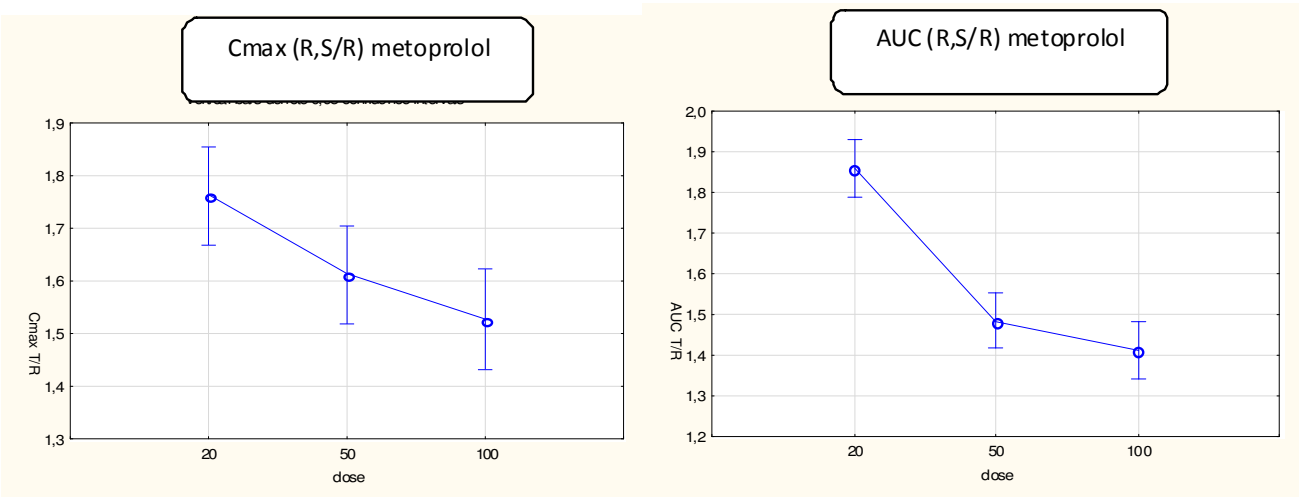

Figura 25 Gráfico de $C_{máx}$ em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (direita), para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seu enantiômero (R)-metoprolol (R,S/R), com intervalo de confiança de 0,95.

Tabela 53 Razão entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (R,S/S), após a administração de 100 mg de metoprolol racêmico em três diferentes regimes.

	$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})	$T_{máx}$ (h)	ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})
Tramento 1: tomada única de 100 mg			
Média	1,87	1,07	470,28
DP	0,24	0,32	17,75
CV%	13,01	30,16	3,78
Tramento 2: duas tomadas de 50 mg			
Média	1,72	1,03	518,74
DP	0,27	0,20	26,22
CV%	15,48	19,65	5,06
Tramento 3: três tomadas de 20 mg			
Média	1,88	0,95	378,00
DP	0,15	0,08	40,27
CV%	8,21	8,77	3,30
Análise de variância (ANOVA): valores de p, usando método de Scheffé*			
Tratamentos 1 e 2	0,130113	0,896132	0,965952
Tratamentos 1 e 3	0,994265	0,288605	0,001193
Tratamentos 2 e 3	0,105479	0,534743	0,002639
Análise *post hoc*	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2 < 3

*Diferenças significativas $p<0,05$

Tabela 54 Intervalo de confiança (IC 95%) para as diferenças entre as razões dos parâmetros farmacocinéticos de (R,S) metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (T/S), considerando o regime de tratamento.

Tratamento	Diferenças	IC
$C_{máx}$ (ng.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	-0,147446	-0,025096 a 0,335369
Tratamento 1 e 3	0,007691	-0,172542 a 0,187924
Tratamento 2 e 3	0,155136	-0,327678 a 0,032787
ASC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})		
Tratamento 1 e 2	0,013222	-0,113001 a 0,139446
Tratamento 1 e 3	0,195689	0,069466 a 0,321913
Tratamento 2 e 3	0,182467	0,056243 a 0,308691

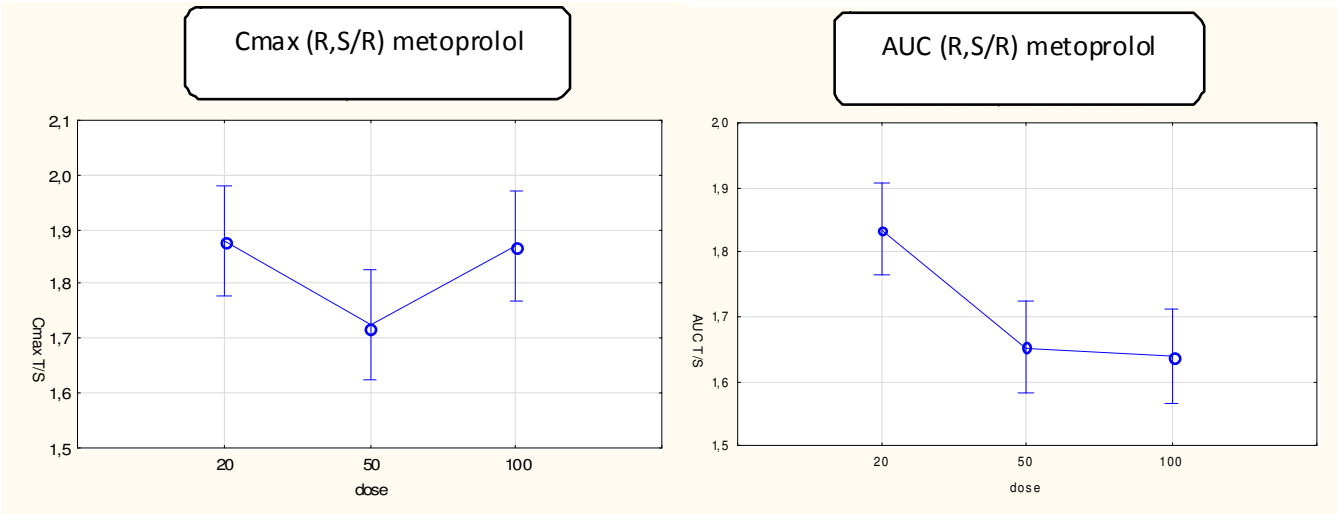

Figura 26 Gráfico de $C_{máx}$ em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (esquerda) e gráfico de ASC em função do tratamento aplicado aos voluntários no estudo clínico (direita), para as razões entre os parâmetros farmacocinéticos de (R,S)-metoprolol e seu enantiômero (S)-metoprolol (R,S/S), com intervalo de confiança de 0,95.

6. DISCUSSÃO

Atualmente existe uma grande discussão entre pesquisadores e agências regulatórias quanto à necessidade de avaliação de um fármaco quiral como mistura racêmica ou como enantiômero isolado para estudos de bioequivalência. Devido a essas contradições é díficil estabelecer um critério geral para avaliar estes fármacos, sendo assim necessário analisar cada caso individualmente.

A utilização de métodos enantioseletivos pode fornecer dados mais precisos em relação a biodisponibilidade e bioequivalência de um determinado fármaco. Para determinar como um fármaco empregado na forma de mistura racêmica deve ser mensurado, se fármaco total ou enantiômeros isolados, é preciso levar em consideração as características de cada enantiômero, suas diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas, além de características da população e custo do método enantioseletivo, que é mais dispendioso. Se um dos enantiômero apresentar diferentes características farmacodinâmicas e absorção não-linear, medidas do enantiômero isolado em estudos de bioequivalância podem ser recomendados (Torrado, 2010). Porém, se os enantiômeros não apresentarem diferenças significativas, com relação a essas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, os métodos enantioseletivos são desnecessários.

Quando se realizam estudos para novos fármacos é mais adequado a utilização de método enantiosseletivo para uma melhor avaliação dos parâmetros farmacocinéticos de cada um dos enantiômeros, uma vez que além de não se ter muitas informações a respeito desse fármaco, este pode também apresentar diferentes taxas de absorção entre seus enantiômeros, o que levaria a diferenças nas suas concentrações plasmáticas (Santoro, 2001).

O metoprolol foi escolhido como fármaco modelo, para avaliar a diferença entre um estudo de biodisponibilidade relativa utilizando método de quantificação do fármaco total e método quiral de quantificação dos enantiômeros isolados, devido as diferenças observadas entre seus enantiômeros, como *clearance*, ligação à proteínas e tecidos, metabolismo e interação com outros fármacos, além da afinidade enantioseletiva para o receptor.

O metoprolol apresenta diversas características que o classificam como fármaco para o qual seria recomendado a análise dos enantiômeros isolados em um ensaio de bioequivalência (Cerqueira, 2003, Sandberg 1993). Seus enantiômeros exibem diferenças farmacodinâmicas, pois o enantiômero (S)-metoprolol exibe uma afinidade significativamente maior pelo receptor de subtipo β_1-adrenérgico que a do (R)-metoprolol (Wahlund et al, 1990). Além da afinidade estereoseletiva pelo receptor, esse fármaco possue alta taxa de biotransformação (Seeringer, 2008).

Nesse estudo foram quantificados o fármaco total e os seus enantiômeros isolados, a fim de estabelecer possíveis consequências das diferenças enantioseletivas na farmacocinética do metoprolol. Foi avaliado, também, a influência da velocidade e forma de entrada do fármaco no organismo, uma vez que esta pode causar interferência nos parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero.

A etapa analítica para a análise das amostras provenientes do estudo de biodisponibilidade relativa compreendeu, primeiramente, o desenvolvimento e a validação de um método bioanalítico para quantificação de (R,S) metoprolol em amostras de plasma e desenvolvimento e a validação de um método enantioseletivo para quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em amostras de plasma.

A quantificação de fármacos em amostras biológicas em estudos de biodisponibilidade relativa, tanto para métodos convencionais quanto para métodos quirais, consideram os seguintes fatores:

- validação do método utilizado, considerando-se os parâmetros de sensibilidade, reprodutibilidade, linearidade, especificidade, precisão, exatidão e estabilidade;
- interação do fármaco com a matriz biológica das amostras;
- avaliação de interferentes presentes na amostra;
- estabelecimento de condições adequadas de armazenamento das amostras, determinando sua estabilidade.

Estão descritos na literatura diversos métodos convencionais (Jesen, 2008; Farca, 2003; Yilmaz, 2010) para quantificação de (R,S) metoprolol e métodos quirais (Boralli, 2005; Cerqueira, 2002; Krstulovic, 1988; Singh, 2001; Ching, 1989) para quantificação dos seus enantiômeros em plasma por cromatografia líquida com detector por fluorescência e UV. Estes trabalhos foram utilizados como ponto de partida para o desenvolvimento do método bioanálitico do presente trabalho.

O método de detecção escolhido, para ambos os métodos, foi por fluorescência, por ter proporcionado maior sensibilidade e especificidade em relação à detecção por UV, com limite de detecção adequado à aplicação em estudos de farmacocinética.

Outro parâmetro importante é a escolha do padrão interno. O padrão interno é geralmente um composto com características estruturais similares ao analito, e que, no caso do método em questão, seja detectado por fluorescência. Neste trabalho, utilizou-se o ofloxacino como padrão interno, pois este apresentou adequada seletividade nos métodos desenvolvidos, tempo de eluição adequado para a corrida cromatográfica e detecção por fluorescência.

As amostras biológicas obtidas dos voluntários e destinadas aos estudos de biodisponibilidade passaram por tratamento prévio à análise cromatográfica, objetivando uma separação livre de interferentes. Na maioria dos trabalhos a purificação do metoprolol, a partir da matriz biológica, se deu por meio de precipitação de proteínas utilizando acetonitrila (Jesen, 2008; Farca, 2003; Yilmaz, 2010). Essa técnica de extração tem como vantagem o baixo custo e maior rapidez no processo.

A precipitação de proteínas empregando acetonitrila foi a técnica de escolha para o estudo em questão por conta do volume de amostras a serem analisadas e por apresentar baixa quantidade de interferentes endógenos nos tempos de retenção do analito e padrão interno.

Para o método de quantificação do metoprolol total o tempo de cada análise cromatográfica foi de 10 minutos, com tempos de retenção de 4,5 e 8,0 minutos para o ofloxacino e metoprolol respectivamente. Esse método

apresentou limite de quantificação de 5 $ng.mL^{-1}$, com precisão e exatidão de 10,13 % e 88,81 %, respectivamente, o que possibilitou a quantificação de metoprolol na fase terminal de decaimento plasmático, onde são observadas baixas concentrações.

A análise de regressão da curva de calibração demonstrou que o método é linear no intervalo de concentração de 5 a 500 $ng.mL^{-1}$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9993. A recuperação média foi de 73,5% para o metoprolol, sendo um valor satisfatório para as análises das amostras dos voluntários.

Os valores obtidos para análise de amostras de metoprolol em plasma no mesmo dia (intra-dia) apresentaram precisão entre 3,76 a 5,71% e exatidão entre 90,28 a 95,67 %. Amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias) apresentaram precisão entre 3,76 a 6,06 % e exatidão entre 91,29 a 96,68 %.

Para o método quiral de quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol foi utilizada uma coluna quiral do tipo Chiralcel OD® derivada de carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil, com fase móvel constituída de hexano, etanol e dietilamina, utilzada em diversos trabalhos para a quantificação de beta bloqueadores, entre eles o metoprolol (Boralli, 2005; Cerqueira, 2002; Krstulovic, 1988; Singh, 2001; Ching, 1989).

Nesse tipo de coluna o reconhecimento quiral dos beta-bloqueadores ocorre através da ligação entre o hidrogênio do grupo –OH da parte aminoálcool do composto e o grupo carboxila do derivado de fenilcarbamato. As interações entre as duplas ligações e a inclusão parcial dos enantiômeros na fase estacionária também são responsáveis pela separação enantiomérica.

A coluna Chiralcel OD® é uma coluna de fase normal, ou seja, utiliza solventes apolares como fase móvel. O pricipal solvente utilizado para essa condição é o hexano, juntamente com etanol e isopropanol como modificadores orgânicos.

Foram realizados testes empregando hexano e etanol em diferentes proporções com e sem adição de dietilamina a fase móvel, a fim de obter uma separação adequada com tempo de análise reduzido. A adição de dietilamina à fase móvel promoveu uma melhor resolução dos picos e redução no tempo de

retenção Durante o desenvolvimento do método verificou-se que temperaturas mais baixas promoviam separação mais eficiente, definindo-se a temperatura de 25 °C como ótima para o método desenvolvido.

O tempo de cada corrida cromatográfica foi de 10 minutos, com tempos de retenção de 4,0; 6,0 e 8,0 minutos para o ofloxacino, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente. O método apresentou limite de quantificação de 10 $ng.mL^{-1}$, com precisão de 11,80 % e 11,54 % e exatidão de 74,88 % e 77,66% para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente.

A curva de calibração demonstrou que o método é linear no intervalo de concentração de 10 a 500 $ng.mL^{-1}$, com coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9952 e 0,996 para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente. A recuperação média foi de 67,57% e 67,97% para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente, sendo um valor satisfatório para as análises das amostras dos voluntários.

Os valores obtidos para análise de amostras de metoprolol em plasma no mesmo dia (intra-dia) apresentaram precisão entre 5,6 % a 8,69 % e 4,75 % a 9,01 % e exatidão entre 84,62 % a 86,69 % e 82,68 % a 84,84 % para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente. Amostras analisadas em dias diferentes (inter-dias) apresentaram precisão entre 5,99 % a 8,33 % e 5,25 % a 10,07 % e exatidão entre 84,63 % a 86,70 % e 82,63 % a 84,85 % para (R)-metoprolol e (S)-metoprolol respectivamente.

De acordo com os resultados apresentados, os métodos mostraram-se específicos, sensíveis, lineares, precisos e exatos. Todos os parâmetros avaliados durante a validação do método bioanalítico para quantificação de metoprolol em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detecção por fluorescência, estão de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA (Brasil, 2003c).

Todos os 20 indivíduos selecionados como voluntários completaram todas as fases do estudo clínico sem intercorrências. Durante a seleção desses voluntários foram observadas características antropométricas, como sexo, idade e relação peso-altura, estado físico, consumo de álcool, tabagismo e ausência de patologias cardíacas, gastrintestinais, neurológicas ou

metabólicas. Foram selecionados somente os voluntários considerados sadios, que não fumassem mais de 10 cigarros por dia, não etílicos e que estivessem na faixa de peso ideal ± 15%.

Os voluntários selecionados foram devidamente informados sobre todos os aspectos que envolviam o estudo, dando seu consentimento de participação por escrito.

A etapa clínica foi dividida em 3 fases, as soluções de metoprolol foram administradas em três regimes diferentes, que simulam diferentes velocidades de liberação do fármaco a partir de uma forma farmacêutica. Os voluntários receberam os três tratamentos empregados em sequência (Fase 1, Fase 2 e Fase 3).

Na Fase 1, os voluntários receberam uma dose única de solução aquosa edulcorada de 100 mg de metoprolol. Na Fase 2 a mesma dose única de 100 mg foi administrada em duas tomadas de 50 mg de metoprolol com intervalo de 30 minutos entre elas. Finalmente, na Fase 3 os voluntários receberam a mesma dose única de 100 mg de metoprolol em cinco tomadas de 20mg a cada 30 minutos. Os comprimidos foram triturados, pesados e divididos nas doses determinadas. No momento da administração o fármaco foi disolvido em solução edulcorada e administrado, juntamente com 200 mL de água, aos voluntários no regime estabelecido para cada fase. Esse esquema de administração foi estabelecido com o intuito de simular uma liberação modificada do fármaco, eliminando também a etapa de dissolução da forma farmacêutica, a fim e avaliar apenas as diferenças de velocidade e extensão de absorção entre o metoprolol total e seus enantiômeros.

Entre todas as fases houve o período de *wash-out* de 7 dias, período superior a 10 meias-vidas de eliminação do metoprolol, garantindo a completa eliminação do fármaco. O período de *wash-out* é definido como um intervalo de tempo suficientemente grande entre dois períodos de tratamento para que o efeito residual de uma formulação administrada num período de tratamento seja eliminado das unidades experimentais para o próximo tratamento.

Fármacos racêmicos com farmacocinética não estereoseletiva apresentam razões de área sob a curva entre os enantiômeros com valores

próximos a 1 (ASC (S) / ASC (R) ≈ 1) e proporções de concentrações plasmáticas (S) / (R) constantes. Portanto, mudando a velocidade de liberação da forma farmacêutica não são esperadas alterações na velocidade de absorção.

O metoprolol é um beta bloqueador que é comercializado como composto racêmico, com faixa terapêutica de 50 mg a 200 mg. Ele é quase completamente absorvido após a administração oral, com baixa taxa de ligação às proteínas plasmáticas, sua biodisponilidade sistêmica varia devido a extensa biotransformação pré-sistêmica. Picos de concentração plasmática são atingidos após 1,5 a 2 horas após a administração do fármaco. O enantiômero (S)-metoprolol expressa maior atividade no bloqueio do receptor β_1-adrenérgico (Regardh, 1980).

A maioria dos estudos realizados que estão relacionados a enantioseletividade na farmacocinética do metoprolol são obtidos a partir de administração de dose única aos voluntários sádios, porém um estudo realizado, por Cerqueira e colaboradores (2002), com administração de doses múltiplas de metoprolol a pacientes hipertensos mostrou haver enantioseletividade em sua farmacocinética, com acúmulo plasmático para (S)-metoprolol. Essa enantioseletividade é resultante da discriminação entre os enantiômeros na eliminação pré-sistêmica após a administração por via oral.

Na etapa estatística, as concentrações plasmáticas de (R,S) metoprolol e seus enantiômeros isolados e os parâmetros farmacocinéticos obtidos para os diferentes tratamentos empregados foram comparados utilizando análise de variância (ANOVA) e determinação do intervalo de confiança 95% (I.C. 95 %) para as diferenças entre os valores médios dos parâmetros farmacocinéticos.

A análise de variância (ANOVA) é uma coleção de modelos estatísticos no qual a variância amostral é particionada em diversos componentes devido a diferentes fatores (variáveis), que nas aplicações estão associados a um processo. Por meio desta partição, a ANOVA estuda a influência destes fatores na característica de interesse. Dessa forma, permite que vários grupos sejam comparados a um só tempo. Esses fatores podem ser de origem qualitativa ou quantitativa, entretanto, a variável dependente deverá necessariamente ser contínua (Zar, 1996).

Utilizou-se método de ANOVA com análise *post hoc* para os parâmetros farmacocinéticos de $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{(1/2)}$ e ASC_{0-t} para (R,S) metoprolol e seus enantiômeros, bem como para as razões entre metoprolol total e cada enantiômero para os parâmetros de C_{max} e ASC_{0-t}, referentes aos três esquemas de administração, seguindo o modelo não compartimental. Foi considerado nível de significância (p) menor que 0,05.

O teste *post hoc* foi realizado utilizando método de Scheffé para discriminar diferenças específicas entre os tratamentos empregados.

O método de Scheffé é um método utilizado para ajustar os níveis de significância em uma análise de regressão linear para comparações múltiplas. É particularmente útil em testes ANOVA, e na construção de intervalos de confiança simultâneos para regressões que envolvem funções de base. O método de Scheffé é um procedimento de comparação única de um único passo que aplica ao conjunto de estimativas de todos os contrastes possíveis entre as médias dos níveis, não apenas as diferenças de pares consideradas pelo método Tukey-Kramerse.

O método estatístico empregado permitiu comparar os parâmetros farmacocinéticos, variáveis dependentes, com os diferentes tipos de administração do fármaco, variável preditora. Os dados farmacocinéticos utilizados para avaliar as diferenças na velocidade do processo de absorção, entre o metoprolol total e seus enantiômeros, foram de concentração plasmática máxima atingida após a administração da dose ($C_{máx}$) e de tempo para atingir essa concentração ($T_{máx}$), enquanto que para estimar as possíveis alterações na extensão de fármaco absorvido foram utilizados os dados de área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* tempo (ASC_{0-t}).

A área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* tempo (ASC_{0-t}) corresponde ao principal parâmetro de biodisponibilidade, por representar a quantidade de fármaco absorvido, enquanto que a concentração plasmática máxima atingida após a administração da dosa ($C_{máx}$) é um parâmetro híbrido, ou seja, relacionado à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção.

A comparação entre os três tratamentos utilizados por meio dos parâmetros $C_{máx}$, ASC_{0-t} e $T_{máx}$ de (R,S)-metoprolol, (R)-metoprolol e (S)-metoprolol indicou a presença de diferenças significativas entre os tratamentos, conforme era esperado. Apenas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos 1 e 2 para o parâmtero $C_{máx}$ de (R,S)-metoprolol e $C_{máx}$ de (R)-metoprolol, e entre os tratamentos 1 e 3 para o parâmetro ASC_{0-t} de (R,S)-metoprolol. O tratamento 1 apresentou valores menores de $C_{máx}$ em relação aos tratamentos 2 e 3 tanto para o metoprolol total quanto para os enantiômeros. Os tratamentos 1 e 2 foram equivalentes em relação ao $C_{máx}$ de (R,S)-metoprolol e de (R)-metoprolol, mas diferentes em relação ao $C_{máx}$ de (S)-metoprolol (o tratamento 1 apresentou $C_{máx}$ deste enantiômero menor que o tratamento 2). Em relação ao parâmetro $T_{máx}$, observou-se que os três tratamentos foram diferentes entre si, com o tratamento 1 apresentando os menores valores de $T_{máx}$ e o tratamento 3 apresentando os maiores valores, tanto para o metoprolol total quanto para seus enantiômeros. Na comparação dos tratamentos pelo parâmetro de ASC_{0-t}, observou-se que o tratamento 2 apresentou os maiores valores de ASC_{0-t} tanto para o metoprolol total quanto para seus enantiômeros. Para os dois enantiômeros observou-se também que a ASC_{0-t} do tratamento 3 foi inferior à do tratamento 1, enquanto que para o metoprolol total não houve diferença significativa para ASC_{0-t} entre os tratamentos 1 e 3.

Foram analisadas também as razões entre os valores de $C_{máx}$ e ASC_{0-t} de (R,S)-metoprolol e cada um de seus enantiômeros.

A análise da relação entre $C_{máx}$ de metoprolol total e $C_{máx}$ de (R)-metoprolol ($C_{máx}$ R,S/ $C_{máx}$ R), indicou que os tratamentos 1 e 2, e 2 e 3 foram semelhantes, enquanto que os tratamentos 1 e 3 foram estatisticamente diferentes, sendo que a relação entre os valores de $C_{máx}$ foi menor no tratamento 1 e maior no tratamento 3 ($1 < 2 < 3$). A análise da relação entre $C_{máx}$ de metoprolol total e Cmax de (S)-metoprolol ($C_{máx}$ R,S/ $C_{máx}$ S) indicou que os três tratamentos foram semelhantes entre si (1,2,3).

Portanto, não se observaram alterações significativas entre a razão (R,S)-metoprolol e (S)-metoprolol, enquanto que para a razão entre fármaco total e o enantiômero (R)-metoprolol foi observada uma diferença entre os

tratamento 1 e 3, o que justifica a aproximação entre curvas de decaimento plasmáticos dos enantiômeros (R)- e (S)-metoprolol observada para o tratamento 3.

A análise da relação entre ASC_{0-t} de metoprolol total e seus enantiômeros indicou diferenças significativas entre os tratamentos 1 e 3 e entre os tratamentos 2 e 3 para os dois enantiômeros, mas não indicou diferença entre os tratamentos 1 e 2.

Assim, não foram observadas diferenças entre os tratamento 1 e 2 tanto para as razões (R,S)-metoprolol sobre (R)-metoprolol, quanto para as razões (R,S)-metoprolol sobre (S)-metoprolol. Entretanto, foram observadas diferenças entre os tratamentos 1 e 3 para as razões de $C_{máx}$ entre (R,S)-metoprolol e (R)-metoprolol e para as razões de ASC_{0-t} entre (R,S)-metoprolol e (R)-metoprolol e entre (R,S)-metoprolol e (S)-metoprolol. Os tratamentos 2 e 3 também se diferenciaram em função das razões de ASC_{0-t} entre (R,S)-metoprolol e (R)-metoprolol e entre (R,S)-metoprolol e (S)-metoprolol.

A avaliação dos resultados indica uma cinética enantioseletiva para o metoprolol, que pode ter ocorrido devido a diferenças inter-individuais com relação ao tipo de metobolizador expresso, já que o metoprolol extensa biotransformação. Essa estereoseletividade também se mostrou dependente da velocidade de entrada do fármaco no organismo, uma vez que os valores de ASC_{0-t} para (R,S)-metoprolol, (R)- e (S)-metoprolol foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos empregados.

Além disso, a biodisponibilidade do (S)-metoprolol foi menor em todos os tratamentos, que pode ter ocorrido devido a uma biotransformação pré-sistêmica dose-dependente.

Portanto, essas diferenças observadas na biodisponibilidade para o metoprolol total e seus enantiômeros entre os tratamentos indica que a afirmação de equivalência terapêutica deve ocorrer levando-se em consideração a velocidade de entrada do fármaco no organismo.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que:

- O método bioanalítico desenvolvido e validado para quantificação de metoprolol em amostras de plasma humano, apresentou seletividade, linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade adequados à sua finalidade;

- O método bioanalítico quiral desenvolvido para a quantificação dos enantiômeros (R)-metoprolol e (S)-metoprolol em amostras de plasma humano, apresentou separação adequada para os enantiômeros com seletividade, linearidade, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade adequados para a análise das amostras obtidas;

- Verificou-se que os diferentes tratamentos administrados aos voluntários simularam adequadamente diferentes velocidades de liberação do fármaco metoprolol.

- A análise farmacocinética para o fármaco (R,S) – metoprolol e seus enantiômeros e a comparação entre seus parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração oral do metoprolol, indicam uma cinética enantioseletiva para o metoprolol, que pode ter ocorrido devido a uma biotransformação pré-sistêmica dose-dependente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 AHUJA, S. Chiral separations by chromatography. Ed Oxford, New York, 2000.

2 BEESLEY, T. E. Review of chiral stacionary phase development and chiral applications. LC GC Europe, v. 24, p. 270 – 289, 2011.

3 BONATO, P. S., JABOR, V.A.P., GAITANI, C. M. Enantioselective analysis of drugs: Contributions of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Quim. Nova*, v. 28, p. 683 – 691, 2005.

4 BONI, J.P., KORTH-BRADLEY, J.M., RICHARDS, L., CHIANG, S.T., HICKS, D.R., BENET, L.Z. Chiral bioequivalence: effect of absorption rate on racemic etodolac. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 39, p. 459-469, 2000.

5 BORALLI, VB, COELHO, EB, CERQUEIRA, PM, LANCHOTE, VL. Stereoselective analysis of metoprolol and its metabolites in rat plasma with application to oxidative metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Vol. 823, issue 2, pg. 195-202, 2005.

6 BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução 1170 de 19 de abril de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, 16 de abril de 2006. Seção 1. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos]. 2006.

7 BRESSOLLE, F., BROMET-PETIT, M., AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B.: Biomed. Appl.*, v. 686, p. 3-10, 1996.

8 BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, v. 27, p. 387-406, 2006.

9 BUENO, M.M. Implantação, evolução, aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica de biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil. São Paulo, 2005. 193 p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

10 CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B.: Biomed. Appl.*, v. 689, p. 175-180, 1997.

11 CERQUEIRA , P.M., BORALLI, V.B., COELHO, E.B., LOPES, N.P., GUIMARÃES, L.F.L., BONATO, P.S., LANCHOTE, V.L. Enantioselective

determination of metoprolol acidic metabolite in plasma and urine using liquid chromatography chiral columns: applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, v. 783, p. 433–441, 2003.

12 CERQUEIRA, P. M., CESARINO, E.J., BERTUCCI, C., BONATO, P.S., LANCHOTE, V.L. Stereoselective Metabolism of Metoprolol: Enantioselectivity of α-Hydroxymetoprolol in Plasma and Urine. *Chirality,* 15, p.542-549, 2003.

13 CERQUEIRA, P. M., CESARINO, E.J., MERE JR, F.H.M.Y., SANTOS, S.R.C.J., LANCHOTE, V.L. Enantioselectivity in the Steady-State Pharmacokinetics of Metoprolol in Hypertensive Patients. *Chirality,* 11, p.591-507, 1999.

14 CHING, M.S., LENNARD, M.S., GREGORY, A., TUCKER, G.T. Measurement of underivatized metoprolol enantiomers in human plasma by HPLC with a chiral stationary phase. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*. Vol. 497, pg. 313 – 318, 1989.

15 DAVIES, N. M., TENG, X. W. Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry. *Advances in Pharmacy* Volume 1, Number 3, pp. 242–252. 2003.

16 EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICAL PRODUCTS. Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. London: EMEA, 2001. 19p.

17 FARCA, A.; TACHE, F.; MEDVEDOVICI, A.; DAVID, V. Validation of the assay of metoprolol in human plasma using liquid-liquid extraction and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chemia Analityczna*, v. 48, p. 677-688, 2003.

18 FEDERSEL, H. Facing chirality in the 21st century: Approaching the challenges in the pharmaceutical industry. *Chirality*, v. 15, p. 128 – 142, 2003

19 GARCIA-ARIETA, A., ABAD-SANTOS, F., RODRIGUEZ-MARTINEZ, M.A., VARAS-POLO, Y., NOVALBOS, J., LAPARIDIS, N., GALLEGO-SANDIN, S. ORFANIDIS, K., TORRADO, J. An eutomer/distomer ratio near unity does not justify non-enantiospecific assay methods in

bioequivalence studies. *Chirality*, v. 17, p. 470–475, 2005

20 GLEITER, C.H., KLOTZ, U., KUHLMANN, J., BLUME, H., STANISLAUS, F., HARDER, S., PAULUS, H., POETHKO-MÜLLER, C., HOLZ-SLOMCZYK, M. When are bioavailability studies required? A German proposal. *J. Clin. Pharm.*, New York, v.38, n.10, p.904-911, 1998.

21 GUBITZ, G. Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stacionary phases – a selective review. Chromatographya, v. 30, p. 555 – 564, 1990.

22 GUBITZ, G. and SCHMID, M. G. Chiral separations, methods and protocols. Human Press, 1° ed. New Jersey, 2004.

23 HEALTH CANADA. Guidance for Industry: Stereochemical Issues in Chiral Drug Development Ottawa: Health Canada Publications 2000 11p

24 HERCHUELZ, A. Bioequivalence assessment and the conduct of bioequivalence trials: a European point of view. *Eur. J. Drug Metab. and Pharmacokinet.*, Geneva, v.21, n.2, p.149-152, 1996.

25 HIEP, B.T., FERNANDEZ, C., KHANH, V., HUNG, N.K., THUILLIER, A., FARINOTTI, R., ARNAUD, P., GIMENEZ, F. Stereospecific versus nonstereospecific assessments for the bioequivalence of two formulations of racemic chlorpheniramine. *Chirality*, v. 12, p. 599–605, 2000

26 JESEN, B. P., SHARP, C.F., GARDINER, S.J., BEGG, E.J. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of S- and R-metoprolol in human plasma. *Journal of Chromatography B*, vol. 865, pg. 48-54, 2008.

27 KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica.* 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006

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

29 KUBON, C., MISTRY, N.B., GRUNDVOLD, I., HALVORSEN, S., KJELDSEN S.E., WESTHEIM, A.S. The roleof beta-blockers in the treatment of chronic heart failure. *Trends in Pharmacological Sciences*, vol.32, N. 4, p. 206-212, april 2011

30 LEFFINGWELL, J. C. Chirality & Bioactivity : Pharmacology. *Leffingwell*

Reports, v. 3, p. 1 – 27, 2003

31 LI, B., HAYNIE, D. T. Chiral Drug Separation. *Encyclopedia of Chemical Processing*, p. 449 – 458, 2006.

32 MEHVAR, R., BROCKS, D.R. Stereospecific pharmacokinects and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in human. *J. Pharm Pharmaceutic Sci,* 4(2), p. 185-200, 2001

33 MEHVAR, R., JAMALI, F. Bioequivalence of chiral drugs: stereospecific versus non-stereospecific methods. *Clin. Pharmacokin.*, v. 33, p. 122- 141, 1997

34 MENON S., KHAIRNAR B., PALEKAR A., KANDARI K., JOSHI N. Bioequivalence study of chirally pure S-metoprolol IR 50 mg Tablet: A Randomized, open label, single dose, crossover study in healthy adult Indian subjects. *International Journal of Current Pharmaceutical Research.* Vol 3, Issue 3, 2011

35 MEREDITH, P.A. Generic drugs: therapeutic equivalence. *Drug Saf.*, Auckland, v.15, n.4, p.233-242, 1996.

36 MIDHA, K.K., MCKAY, G., RAWSON, M.J., HUBBARD, J.W. The impact of stereoisomerism in bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 797-802, 1998.

37 MISTRY, B., LESLIE, J. L., EDDINGTON, N. D. Influence of input rate on the stereospecific and nonstereospecific first pass metabolism and pharmacokinetics of metoprolol extended release formulations. *Chirality*, v. 14, p. 297 – 304, 2002.

38 MOSTAFAVI, S.A., FOSTER, R.T. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers following sing and multiple administration of racemate in rats. *International journal of pharmaceutics*, v. 202, p.97-102, 2000.

39 NATION, R.L., SANSOM, L.N. Bioequivalence requirements for generic products. *Pharmac. Ther.*, v. 62, p. 41-55, 1994.

40 PAPADOUPOULOS, D.P., PAPADEMETRIOU, V. Metoprolol succinate combination in the treatment of hypertension. *Angiology*, vol.60, n.5, p.608-613, 2009.

41 PORTA, V. Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol. São Paulo, 1999. 129p. (Tese de Doutorado

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

42 RASOOL, F., AHMAD, M., MURTAZA, G., KHAN, H. M. S., KHAN, S.A. Pharmacokinetic studies on metoprolol – Eudragit matrix tablets and bioequivalence consideration with Mepressor®. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 11 (2), p. 281-287, 2012.

43 REGARDH, C. G.; JOHNSON, G. Clinical pharmacokinetic of metoprolol. *Clin. Pharmacokinet*. New York, vol. 5, p. 557 – 569, 1980.

44 RITSCHEL, W.A. Handbook of basic pharmacokinetics. 4.ed., Hamilton: Drug Intelligence, 1992. 588p.

45 SAHAJWALLA, C. Regulatory Considerations in Drug Development of Stereoisomers. *Food and Drug Administration*, Rockville, Maryland, U.S.A, 2004.

46 SANDBERG, A.; ABRAHAMSSON, B.; REGARDH, C.G. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers after administration of the racemate and the s-enantiomer as oral solutions and extended-release tablets. *Drug Investigation*, v. 6, p. 320-329, 1993.

47 SANTORO, M. I. R. M,, SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol. 37, n. 3, pg. 259 – 268, 2001.

48 SCHMID, M. G., GUEBITZ, G. Enantionseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligant-exchange as chiral separation principle. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 400, p. 2305 – 2316, 2011.

49 SEERINGER, A., BROCKMOLLER, J., BAUER, S., KIRCHHEINER, J. Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise-induced heart rate. *Eur J Clin Pharmacol*. Vol. 64, pg. 883 – 888, 2008.

50 SHARGEL, L., YU A.B.C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 3.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. 626p.

51 SINGH, A.K., KEDOR-HACKMANN, E.R.M., SANTORO, M.I.R.M. Development and validation of a chiral liquid chromatographic method for the determination of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet

preparations. *Journal of AOAC international*, vol. 84, n. 6, 2001

52 SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing…Only Different. *Toxicological sciences*, vol. 110(1), p. 4–30, 2009.

53 SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, 1. Rio de Janeiro: LTC, 8° ed, 2005, cap. 5, p. 181 – 221.

54 SRINIVAS, N. R. Evaluation of experimental strategies for the development of chiral chromatography methods based on diastereomer formation. *Biomedical Chromatography*, v. 18, p. 207 – 233, 2004.

55 SRINIVAS, N.R. Role of stereoselective assays in bioequivalence studies of racemic drugs: have we reached a consensus? *J. Clin. Pharmacol.*, v. 44, p. 115-119, 2004.

56 SRINIVAS, N.R., BARR, W.H., SHYU, W.C., MOHANDOSS, E., CHOW, S., STAGGERS, J., BALAN, G., BELAS, F.J., BLAIR, I.A., BARBHAIYA, R.H. Bioequivalence of two tablet formulations of nadolol using single and multiple dose data: assessment using stereospecific and nonstereospecific assays. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 299-303, 1996

57 STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica. Guanabara Koogan, 1° ed., Rio de Janeiro, 2009.

58 STORPIRTIS, S. Farmacocinética Básica e aplicada, Guanabara Koogan, 1° ed., Rio de Janeiro, 2011.

59 TORRADO, J. J., BLANCO, M., FARRÉ, M., ROSET, P., GARCÍA-ARIETA, A. Rationale and conditions for the requirement of chiral bioanalytical methods in bioequivalence studies. *Eur J Clin Pharmacol*, vol. 66, pg. 599 – 604, 2010.

60 TUCKER, G. T., LENNARD, M. S. Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmc Ther*, v.45, p. 309 – 329, 1990.

61 UNITED STATES. Departament of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. Rockville: CMC, 2003. 26p.

62 WORMKE, M., PUZIK, A., POCHIC, I., STERNS, T., WIEDMANN, M., WEDEL, C., STOSIK, A. A comparative bioequivalence study of two

prolonged-release metoprolol preparations. Geriatria, vol. 6, p. 34 – 40, 2012.

63 YILMAZ, B, ASCI, A, ARSLAN, S. Determination of metoprolol in human plasma and urine by HPLC with fluorescence detection. *J. Sep. Sci*. Vol. 33, pg. 1904 – 1908, 2010.

64 ZAR, J. H. Biostatistical analysis. Prentice Hall, 3° ed., New Jersey, 1996.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do comitê de ética
em pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO

Protocolo CEP nº495
Parecer CEP nº 36/2009

Sra. Pesquisadora,
Francinalva Dantas de Medeiros

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros
Pesquisador Responsável:	Francinalva Dantas de Medeiros
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Área Temática Especial:	
Patrocinadores:	

II - Sumário Geral do Protocolo

Muitos dos fármacos são encontrados na forma de misturas racêmicas, ou seja, mistura contendo enantiômeros, isômeros, complementares na proporção de 50:50. Esses podem apresentar diferenças quantitativas e qualitativas de ação farmacológica, bem como diferenças entre seus perfis de decaimento plasmático. Em função dessas diferenças, a quantificação de fármaco total em fluidos biológicos pode ocasionar falhas na interpretação de dados farmacocinéticos, farmacodinâmicos e de relação entre concentração e efeito farmacológico. Esta pode ser, inclusive, uma possível explicação para diferenças de ação entre medicamentos referência e genérico relatadas por alguns pacientes e médicos. Assim, o presente trabalho pretende avaliar a bioequivalência entre formulações sólidas orais contendo metoprolol, mistura racêmica, por meio de ensaios com métodos enantiosseletivos de quantificação de fármacos.

Os objetivos do presente estudo são:

Investigar a influência da velocidade de liberação do metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre o processo de absorção do fármaco total e dos enantiômeros S-metoprolol e R-metoprolol e sobre a relação entre as concentrações plasmáticas destes enantiômeros.

Tipo de estudo:

Trata-se de estudo prospectivo, aleatório, cruzado com a formação de três grupos com igual número de voluntários.

Descrição da Casuística:

Participarão do ensaio de biodisponibilidade 30 voluntários sadios que serão selecionados com base em critérios descritos no próximo item.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

- Os critérios para inclusão dos voluntários sadios são:
- não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal ± 15 %, calculado pela fórmula PI = (H – 100) para homens e PI = 0,9x(H – 100) para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- não devem estar em tratamento com medicamentos;
- voluntárias do sexo feminino não devem estar em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

Além desses critérios, serão analisados os resultados de exames clínicos e laboratoriais e de eletrocardiograma para inclusão do voluntário. De acordo com a Resolução 41/2000 (Brasil, 2000) serão realizados os seguintes exames:

- hemograma completo;
- uréia;
- creatinina;
- fosfatase alcalina;
- glicemia;
- bilirrubina total;
- proteínas totais e albumina;
- transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP);
- ácido úrico;
- colesterol total;
- triglicérides;
- urina tipo I;
- sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C;
- β-HCG para mulheres;
- eletrocardiograma com doze derivações.

Todos os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, serão realizados também no período pós-estudo. Além disso, os voluntários farão outro eletrocardiograma e passarão por uma avaliação médica.

Para os exames laboratoriais de seleção e pós-estudo serão coletados cerca de 6 mL de sangue e 10 mL de urina em cada período.

Durante o estudo serão coletadas amostras de 8 mL de sangue às 0:00, 0:20, 0:40, 1:00, 1:20, 1:40, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00, 10:00, 12:00 e 14:00 horas após o início da administração do medicamento. Em cada fase serão coletados 85 mL de sangue de cada voluntário. Portanto, 255 mL de sangue no final das 3 fases.

Serão critérios de exclusão:
indivíduos que:

- não satisfaçam os critérios de inclusão supracitados;
- apresentem resultados fora da normalidade para os exames clínicos e laboratoriais, segundo critério médico;
- apresentem mal-estar decorrente da retirada de amostras de sangue, tal como tontura, queda de pressão ou desmaio e expressem desejo de serem excluídos do estudo;

- apresentem reações adversas ao medicamento administrado e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- independentemente de qualquer intercorrência, expressem desejo de serem excluídos do estudo.

Os voluntários que apresentarem dados de laboratório com resultados diferentes da faixa de normalidade serão avaliados pelo médico. Serão incluídos os considerados aptos desde que os resultados dos exames laboratoriais não representem risco para o voluntário e nem prejuízo para o estudo.

III - Considerações

Trata-se de pesquisa de doutorado da aluna Francinalva Dantas de Medeiros, sendo orientada pela Profa. Dra. Valentina Porta, especialista em Bioequivalência.

Os documentos necessários para a realização do projeto foram apresentados e encontram-se preenchidos corretamente.

O termo de consentimento livre e esclarecido foi escrito de forma clara e objetiva. Descreve os dados sobre a pesquisa; a justificativa e procedimentos da pesquisa; os desconfortos e riscos esperados; os benefícios que poderão ser obtidos com a pesquisa; o acesso às informações; a possibilidade de recusa e/ou desistência pelo voluntário; a privacidade dos dados; o seguro para garantir indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa; informações de nomes e endereços dos responsáveis pela pesquisa; entre outros. Portanto, atendendo às resoluções do Conselho Nacional de Saúde.

As amostras coletadas serão analisadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e descartadas ao final do estudo. Portanto não haverá formação de banco de material biológico e envio deste material para o exterior.

IV – SITUAÇÃO DO PROTOCOLO: APROVADO

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
- Comunicar ao CEP eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
- Comunicar e justificar a interrupção do projeto;
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 30 de março de 2009.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

São Paulo, 20 de março de 2009.

Il^mo(a). Sr^(a).
Dra. Valentina Porta
Departamento de Farmácia
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros" – **Co-autor(es):** Francinalva Dantas de Medeiros; Alexandre Volney Villa - **Registro CEP-HU/USP**: 876/08 – **SISNEP CAAE:** 0024.0.018.198-08

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 20 de março de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO,** bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 20 de março de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP
Avenida Professor Lineu Prestes, 2565 – Cidade Universitária – 05508-000 São Paulo – SP
Tels.: (11) 3091-9457 ou 9479 – Fax: (11) 3091-9452 - E-mail: cep@hu.usp.br

ANEXO B
Termo de consentimento
livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Voluntário.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ( )M ( )F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº: .....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: **Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros**

2. Pesquisador: **Francinalva Dantas de Medeiros**

Cargo/Função: **Doutorando** Inscrição Conselho Regional Nº: **CRF-SP 44.602**

Departamento da FCF/USP: **Departamento de Farmácia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (**X**) Risco Médio ( ) Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )

4. Duração da Pesquisa: **2 anos**

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa, objetivos e procedimentos da pesquisa:

Este estudo pretende avaliar o comportamento do remédio metoprolol no organismo humano a fim de estabelecer uma forma mais eficiente de comparar os medicamentos genéricos e similares, que contem metoprolol.

O metoprolol é um remédio utilizado no tratamento de pressão alta e problemas do coração.

O remédio que o(a) senhor(a) tomará será um líquido oral obtido a partir de comprimidos de metoprolol comprados em uma farmácia.

Para ser incluído no estudo, o(a) senhor(a) será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina. Serão realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; e β-HCG (para mulheres). As coletas de sangue e urina para exames laboratoriais serão realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP. Para a coleta da urina o(a) senhor(a) irá receber um frasco coletor, e após o período de 2h sem urinar, irá coletar sua urina. Será feito também um eletrocardiograma. A avaliação médica e o eletrocardiograma serão realizados no Hospital Universitário da USP. Ao final do estudo estes mesmos exames laboratoriais e clínicos serão repetidos, juntamente com o eletrocardiograma. As internações para o estudo serão no Hospital Universitário da USP, nos dias do estudo. às 6:00 horas da manhã. O(a) senhor(a) deverá comparecer em jejum de pelo menos 8:00 horas e não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital, pois a partir do momento da internação receberá dieta padronizada.

O(A) senhor(a) permanecerá no hospital durante todo o dia, até às 18:00h, não sendo necessário passar a noite no hospital. O(A) senhor(a) deverá retornar 2 vezes ao hospital para repetir o procedimento e finalizar o estudo.

O estudo será dividido em 3 fases. Na primeira fase o(a) senhor(a) receberá o produto em uma única tomada, na segunda fase o(a) senhor(a) receberá o produto em 2 tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas, e na terceira fase o(a) senhor(a) receberá produto em 5 tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas. O intervalo entre as fases será de, no mínimo, 2 dias. Para avaliar o comportamento do remédio no organismo serão realizadas coletas de sangue nos seguintes tempos: 0:00, 0:50, 1:00, 1:50, 2:00, 2:50, 3:00, 3:50, 4:00, 5:00, 6:00 e 8:00 horas após cada administração do produto. Desta forma, em cada fase serão retirados 85 mL de sangue, e 255 mL no total ao final do estudo. Para evitar que sua veia seja puncionada muitas vezes, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue. O jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o produto.

2. Desconfortos e riscos esperados:

O metoprolol é um remédio muito utilizado no tratamento da pressão alta e problemas do coração. Tem seu uso aprovado em vários países do mundo, inclusive Europa e Estados Unidos e também no Brasil, pelo Ministério da Saúde. O metoprolol é contra-indicado para pacientes com insuficiência cardíaca e com suspeita de infarto agudo do miocárdio. O metoprolol é bem tolerado e as reações adversas são, geralmente, leves e reversíveis. Algumas reações desagradáveis observadas são: diminuição dos batimentos do coração, cansaço, vertigem, dor de cabeça, náusea, dificuldade de respirar após fazer esforço. Porém, tais reações são observadas em pacientes que recebem metoprolol por muitos dias.

Durante as coletas de sangue, algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da picada. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

3. Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos voluntários envolvidos no estudo descrito, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, na medida em que irá avaliar o comportamento desse tipo de remédio no organismo e discutir a forma como os medicamentos genéricos e similares contendo metoprolol devem ser comparados ao medicamento de referência. Assim, no futuro, poderemos ter medicamentos genéricos e similares mais seguros e eficazes.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. O(a) senhor(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. O(a) senhor(a) terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo..
3. Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.
4. Será realizado um seguro para garantir indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones: 3091-3623 / 3091-2217 (Profa. Dra. Valentina Porta e Doutoranda e Farmacêutica Francinalva Dantas de Medeiros)

"Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: CEP-HU/USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 Cidade Universitária CEP: 05508-000, São Paulo – SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br.

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

_____	_____
Assinatura do sujeito de pesquisa	Assinatura do pesquisador
ou responsável legal	(carimbo ou nome legível)

Comitê de Ética em Pesquisa

Hospital Universitário

Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes, 2565

CEP: 05508-000
São Paulo – SP
Telefone: 3091-9457, Fax: 3091-9452
E-mail: cep@hu.usp.br.

ANEXO C

Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO D
Ficha de aluno atualizada

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6599931/1 - Francinalva Dantas de Medeiros

Email:	franmedeiros@usp.br
Data de Nascimento:	10/07/1981
Cédula de Identidade:	RG - 2485338 - PB
Local de Nascimento:	Estado da Paraíba
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal da Paraíba - Paraíba - Brasil - 2004
Mestrado:	Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Área de Farmacoquímica (1) - Universidade Federal da Paraíba - Paraíba - Brasil - 2006

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	02/07/2008
Início da Contagem de Prazo:	02/07/2008
Data Limite:	30/10/2012
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Valentina Porta - 02/07/2008 até o presente. E.Mail: vporta@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Prorrogação:	120 dias Período de 02/07/2012 a 30/10/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 08/12/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 02/07/2008 Prorrogação em 14/03/2012 Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012
Impresso em: 30/10/12 05:40:02

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 6599931/1 - Francinalva Dantas de Medeiros

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5778-1/2	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos	10/09/2008	21/10/2008	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5787-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Tópicos Avançados em Farmacocinética Clínica)	15/09/2008	21/09/2008	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5766-2/2	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	30/09/2008	01/12/2008	90	6	92	A	N	Concluída
FBF5767-2/3	Determinação de Enantiômeros: Modos e Mecanismos de Separação	04/03/2009	14/04/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/1	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	16/03/2009	28/06/2009	45	3	95	A	N	Concluída
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5803-1/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	01/03/2010	14/03/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5748-3/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	02/03/2010	12/04/2010	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	

Disciplinas:	20	20	29
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 2878, de 26.08.2005.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

ANEXO E

Curvas de decaimento plasmático e parâmetros farmacocinéticos individuais para (R,S)-metoprolol

VOLUNTÁRIO 1

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	**0**	162,95	218,84	205,46	156,82	140,68	124,61	97,84	73,17	46,51	30,70	7,94
FASE 2	0,00	83,32	136,85	232,86	216,74	160,37	128,99	119,90	102,61	76,80	47,88	25,86
FASE 3	0,00	18,96	59,47	90,98	95,90	167,47	150,09	126,57	104,34	72,74	56,62	33,37

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	218,84	1,00	0,94	690,07	700,80
FASE 2	232,86	1,50	1,51	766,99	823,21
FASE 3	167,47	2,50	1,82	601,72	633,42

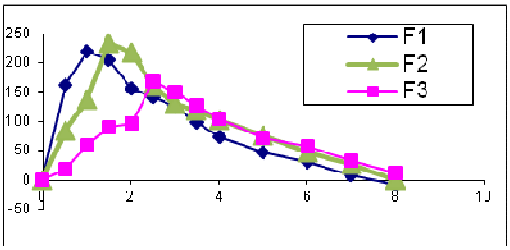

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 2

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	130,31	187,55	207,61	188,30	157,09	129,60	96,64	71,52	48,98	33,77	5,79
FASE 2	0,00	67,61	153,65	286,39	252,22	241,67	167,06	112,06	107,15	79,64	54,32	35,91
FASE 3	0,00	19,03	54,92	94,31	114,94	210,34	194,07	148,49	108,84	90,67	65,82	33,52

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	207,61	1,50	0,83	687,02	693,93
FASE 2	286,39	1,50	1,90	894,76	917,84
FASE 3	210,34	2,50	1,77	694,51	719,00

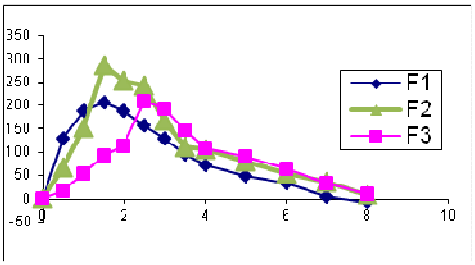

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 3

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	112,72	186,74	276,89	202,11	161,00	117,14	89,10	65,52	41,51	28,08	11,68
FASE 2	0,00	72,98	161,36	212,57	168,45	162,04	117,10	102,96	93,81	68,47	51,70	26,54
FASE 3	0,00	20,36	76,50	109,48	112,39	208,47	194,73	159,21	112,07	95,03	56,10	42,48

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	276,89	1,50	1,21	700,10	720,41
FASE 2	212,57	1,50	1,65	720,45	742,50
FASE 3	208,47	2,50	2,14	730,13	803,74

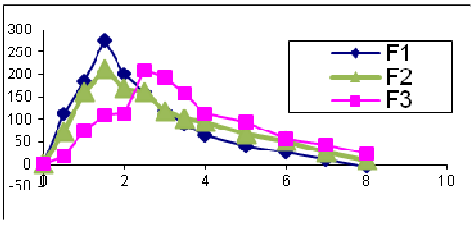

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 4

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	**0**	160,65	213,17	294,76	253,28	162,34	116,45	81,01	58,20	51,80	23,50	5,87
FASE 2	0,00	72,81	160,32	203,26	186,47	135,56	118,97	113,85	92,52	64,69	48,23	27,60
FASE 3	0,00	20,68	57,34	89,69	117,38	197,42	156,07	117,84	108,78	71,09	62,06	40,24

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	294,76	1,50	0,91	764,84	772,52
FASE 2	203,26	1,50	1,72	707,47	717,10
FASE 3	197,42	2,50	2,09	644,49	712,70

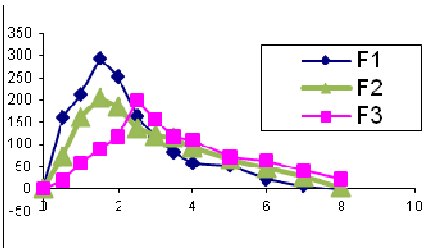

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 5

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	153,80	236,38	197,63	164,61	133,40	111,68	93,33	74,12	59,69	28,91	7,65
FASE 2	0,00	94,51	148,15	227,33	254,17	160,36	132,96	109,50	103,77	75,58	47,14	22,77
FASE 3	0,00	17,73	58,58	102,97	134,41	198,19	161,90	135,43	105,85	93,79	58,18	37,95

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	236,38	1,00	0,92	694,52	704,63
FASE 2	254,17	2,00	1,37	791,41	809,67
FASE 3	198,19	2,50	2,03	682,19	731,36

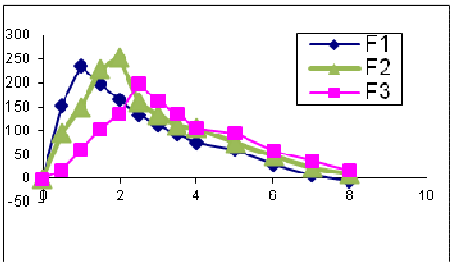

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 6

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	135,35	225,19	160,48	139,96	113,91	87,03	72,27	55,73	38,01	18,94	14,38
FASE 2	0,00	56,52	107,88	183,70	236,53	166,95	103,41	102,56	80,87	68,53	52,11	26,90
FASE 3	0,00	24,67	63,06	112,71	207,30	176,82	127,46	114,13	104,26	82,86	63,09	41,71

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	225,19	1,00	1,53	577,19	609,03
FASE 2	236,53	2,00	1,89	690,71	711,06
FASE 3	207,30	2,00	2,27	689,91	761,82

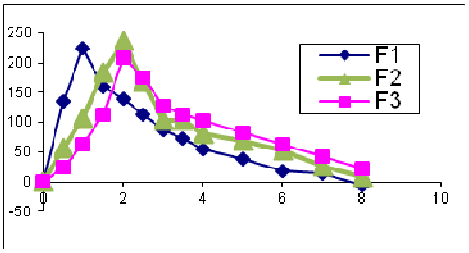

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 7

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	144,86	232,14	184,18	154,04	109,15	90,16	75,52	59,32	35,89	24,06	10,58
FASE 2	0,00	68,75	140,00	195,17	265,63	189,02	128,80	111,67	82,29	55,84	47,98	20,79
FASE 3	0,00	22,97	64,77	115,96	211,88	174,61	162,00	110,92	90,90	80,45	74,37	48,61

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	232,14	1,00	1,21	607,19	625,62
FASE 2	265,63	2,00	1,51	738,59	750,58
FASE 3	211,88	2,00	3,32	713,70	814,76

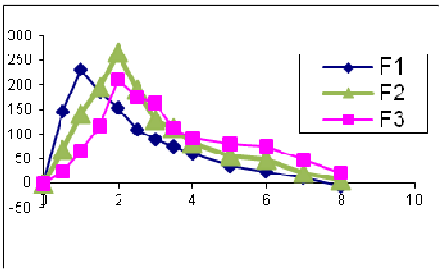

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 8

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	183,91	217,53	242,68	185,75	155,27	129,01	106,66	103,97	69,20	30,59	6,78
FASE 2	0,00	74,39	145,87	260,23	202,28	160,08	125,72	112,11	99,57	89,16	69,26	34,59
FASE 3	0,00	23,08	76,20	97,95	116,84	215,09	177,61	178,27	98,82	89,78	69,32	35,28

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	242,68	1,50	0,76	793,17	800,62
FASE 2	260,23	1,50	1,97	811,10	828,56
FASE 3	215,09	2,50	2,02	715,86	744,15

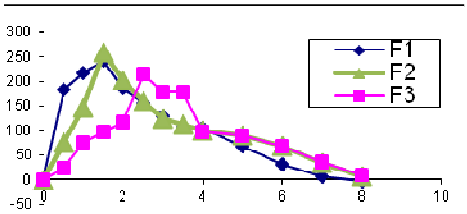

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 9

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	170,24	218,69	201,70	180,49	135,28	122,99	94,73	76,63	48,30	23,52	10,09
FASE 2	0,00	92,51	154,24	260,47	236,27	179,54	129,47	114,75	111,10	77,91	52,74	33,30
FASE 3	0,00	21,12	67,16	106,93	111,47	190,87	179,90	143,95	114,05	93,63	65,06	45,61

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	218,69	1,00	1,03	697,85	712,78
FASE 2	260,47	1,50	1,73	833,47	846,27
FASE 3	190,87	2,50	2,27	704,88	733,41

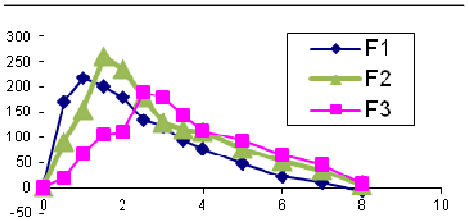

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 10

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	163,97	222,60	191,51	142,58	110,76	93,10	77,39	59,88	35,73	10,33	9,50
FASE 2	0,00	73,10	164,50	224,62	288,12	172,42	123,07	109,43	87,16	73,14	61,63	22,91
FASE 3	0,00	31,18	72,85	115,61	209,54	226,61	168,15	114,88	95,45	81,26	65,74	35,82

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	222,60	1,00	1,13	601,15	616,64
FASE 2	288,12	2,00	1,56	805,36	826,35
FASE 3	226,61	2,50	2,12	737,63	822,11

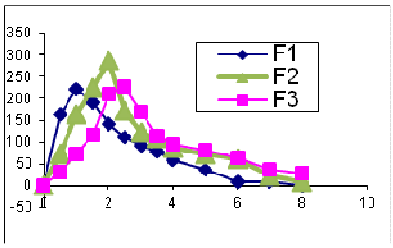

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 11

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	147,00	226,76	190,80	168,29	134,23	113,59	98,87	68,48	46,57	27,04	6,58
FASE 2	0,00	80,66	134,10	268,71	202,77	181,94	139,39	123,11	104,15	78,34	48,64	21,55
FASE 3	0,00	30,01	77,87	106,20	106,46	207,45	147,25	114,47	116,19	87,17	67,50	44,67

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	226,76	1,00	0,89	669,57	677,99
FASE 2	268,71	1,50	1,32	795,25	807,65
FASE 3	207,45	2,50	2,17	692,89	765,33

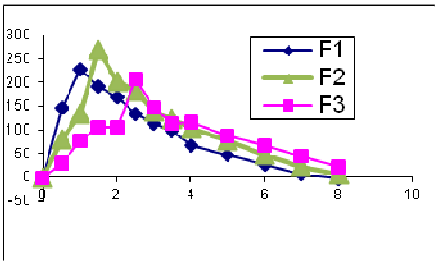

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 12

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	117,47	177,24	210,47	175,74	142,25	120,28	97,41	78,42	53,43	35,54	6,04
FASE 2	0,00	77,17	111,53	217,46	179,59	148,51	122,82	121,75	104,55	72,28	61,63	25,55
FASE 3	0,00	19,37	62,69	85,05	109,27	213,00	205,46	181,79	121,61	100,71	68,74	48,75

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	210,47	1,50	0,81	673,59	680,67
FASE 2	217,46	1,50	1,48	730,56	744,49
FASE 3	213,00	2,50	2,27	757,47	821,50

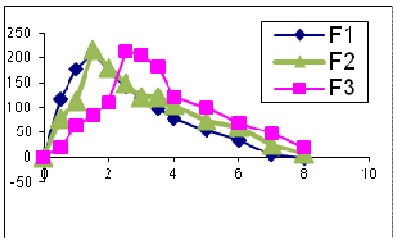

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 13

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	106,80	190,01	259,49	153,53	153,18	116,33	95,88	71,82	37,92	22,29	9,35
FASE 2	0,00	73,41	141,90	252,76	221,97	130,53	115,41	83,68	87,53	62,86	44,60	22,07
FASE 3	0,00	25,91	76,05	113,29	135,02	200,88	182,76	133,67	96,74	80,06	61,82	

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	259,49	1,50	1,02	659,22	672,99
FASE 2	252,76	1,50	1,51	710,29	733,31
FASE 3	200,88	2,50	2,48	704,77	810,24

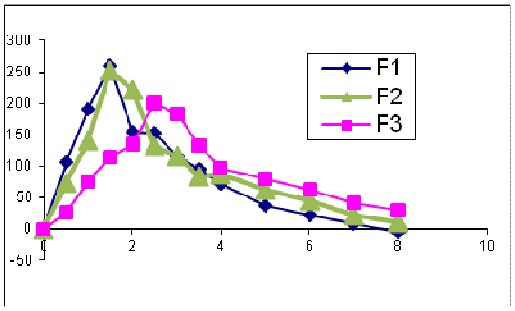

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 14

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	163,29	222,59	280,49	231,92	145,44	120,12	88,60	70,36	56,56	22,25	9,40
FASE 2	0,00	58,99	180,24	241,72	150,91	121,35	127,15	89,38	81,91	52,78	35,93	22,87
FASE 3	0,00	22,71	56,22	85,88	148,34	204,13	198,73	148,48	100,16	87,82	59,80	43,67

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	280,49	1,50	1,03	764,59	778,59
FASE 2	241,72	1,50	1,63	662,21	682,61
FASE 3	204,13	2,50	2,50	706,84	766,05

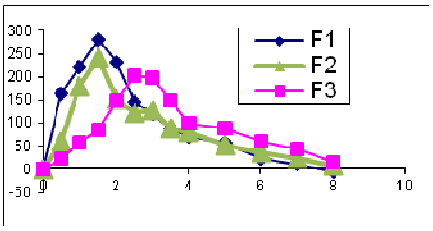

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 15

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	146,15	214,63	171,45	145,91	121,32	99,98	72,25	60,28	42,04	17,80	4,55
FASE 2	0,00	78,51	147,47	235,06	201,82	151,18	116,36	102,99	79,97	61,25	46,76	21,07
FASE 3	0,00	24,72	69,42	99,10	148,32	182,76	142,43	111,68	96,47	86,04	64,32	44,91

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	214,63	1,00	0,80	592,17	597,46
FASE 2	235,06	1,50	1,56	714,99	756,52
FASE 3	182,76	2,50	2,72	666,69	743,94

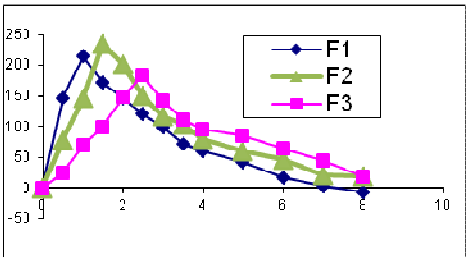

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 16

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	156,75	216,00	156,57	120,57	98,03	94,19	71,73	53,42	32,38	11,44	6,08
FASE 2	0,00	73,00	156,33	188,17	232,86	185,61	141,35	108,20	81,97	64,27	54,63	24,04
FASE 3	0,00	36,80	75,99	101,78	166,99	183,82	156,06	111,61	98,34	84,74	60,65	47,76

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	216,00	1,00	0,96	543,89	552,28
FASE 2	232,86	2,00	1,69	748,59	755,56
FASE 3	183,82	2,50	2,88	691,99	763,10

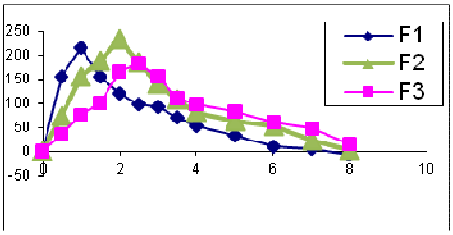

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 17

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	184,56	239,04	208,97	164,33	107,10	76,39	59,77	54,50	33,89	17,69	8,20
FASE 2	0,00	69,20	186,89	233,98	287,14	207,21	154,04	128,29	95,42	55,19	47,42	19,30
FASE 3	0,00	35,11	66,49	156,60	221,98	140,97	135,90	112,79	83,73	62,78	48,89	41,86

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	239,04	1,00	1,10	618,62	631,61
FASE 2	287,14	2,00	1,30	828,92	836,69
FASE 3	221,98	2,00	3,00	658,73	723,46

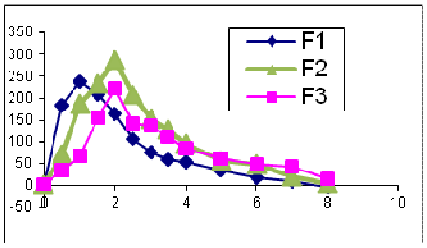

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 18

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	129,85	216,36	211,99	155,05	123,62	112,37	102,96	83,32	58,50	43,49	10,30
FASE 2	0,00	77,60	145,50	241,51	192,99	148,08	127,30	110,02	93,96	80,94	59,24	28,38
FASE 3	0,00	26,28	84,97	106,79	153,43	196,23	160,93	141,07	106,53	87,65	72,44	38,25

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	216,36	1,00	0,99	699,61	714,40
FASE 2	241,51	1,50	1,74	765,49	790,32
FASE 3	196,23	2,50	2,03	716,72	737,98

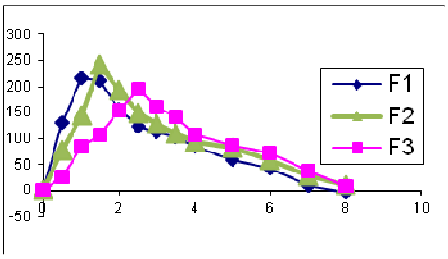

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 19

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	131,54	200,83	180,94	156,90	134,14	109,32	96,92	77,47	57,39	22,61	9,76
FASE 2	0,00	89,33	169,24	241,39	205,38	168,25	122,05	126,46	98,81	73,22	48,06	31,73
FASE 3	0,00	28,54	77,51	97,89	116,00	182,88	149,16	143,33	126,07	113,78	87,26	62,86

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	200,83	1,00	1,00	649,86	664,00
FASE 2	241,39	1,50	1,83	791,40	808,40
FASE 3	182,88	2,50	2,99	766,86	859,52

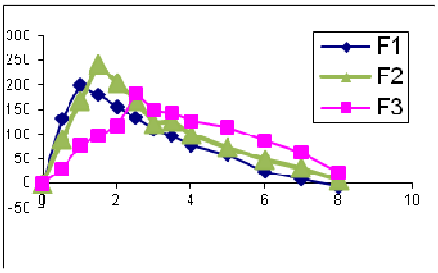

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 20

Tabela Concentrações plasmáticas de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	156,34	216,56	174,38	142,21	116,97	92,97	71,55	54,51	38,00	9,66	6,20
FASE 2	0,00	71,41	173,75	176,25	235,84	179,99	170,28	120,92	113,86	97,29	58,38	33,55
FASE 3	0,00	22,90	69,94	107,09	163,54	197,67	157,52	156,14	130,40	76,08	78,01	57,54

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	216,56	1,00	0,96	577,31	585,88
FASE 2	235,84	2,00	1,70	840,69	849,79
FASE 3	197,67	2,50	2,54	762,11	874,27

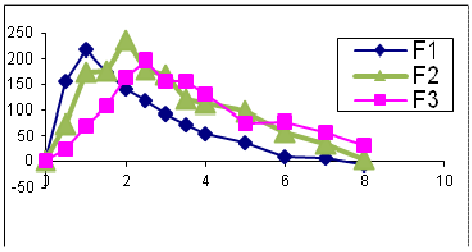

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R,S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

ANEXO F

Curvas de decaimento plasmático e parâmetros farmacocinéticos individuais para (R)-metoprolol

VOLUNTÁRIO 1

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	111,44	147,62	138,04	105,17	95,90	84,45	66,21	49,41	31,63	20,10	0,00
FASE 2	0,00	56,33	92,18	158,32	147,89	109,03	87,60	80,42	69,19	51,71	32,49	0,00
FASE 3	0,00	12,80	40,65	61,48	64,53	114,69	102,85	72,93	61,09	42,26	33,00	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	147,72	1,00	0,93	469,41	470,94
FASE 2	158,42	1,50	1,55	522,40	531,29
FASE 3	114,77	2,50	1,83	380,18	402,90

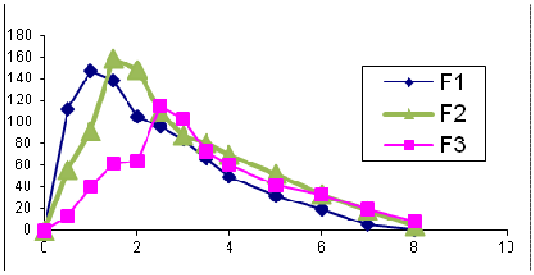

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 2

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	110,73	144,78	136,25	103,89	94,29	81,66	64,23	48,78	31,30	17,20	0,00
FASE 2	0,00	55,63	91,02	149,68	135,58	106,37	85,17	78,70	67,58	50,28	31,77	0,00
FASE 3	0,00	11,64	39,66	60,87	63,20	112,33	102,45	72,25	59,83	40,08	31,34	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	144,88	1,00	0,82	458,14	460,54
FASE 2	149,78	1,50	1,56	503,57	510,47
FASE 3	112,40	2,50	1,73	369,40	387,50

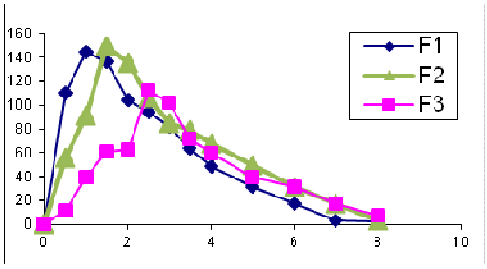

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 3

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	109,77	144,61	134,64	104,09	93,16	82,73	64,08	48,70	29,80	17,10	0,00
FASE 2	0,00	55,63	90,82	149,45	135,57	107,37	85,15	78,58	68,37	50,43	32,01	0,00
FASE 3	0,00	11,51	39,58	60,72	63,11	113,28	101,58	71,95	59,75	41,10	31,52	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	144,71	1,00	0,70	454,08	456,65
FASE 2	149,55	1,50	1,66	506,34	513,06
FASE 3	113,35	2,50	1,75	369,93	385,99

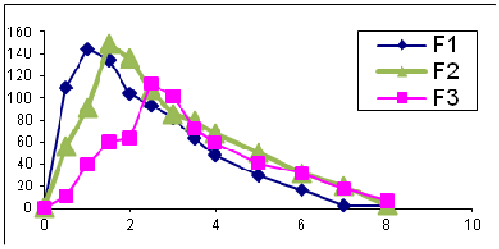

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 4

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	112,36	151,50	138,03	105,11	95,93	84,21	65,61	49,09	32,83	19,95	0,00
FASE 2	0,00	57,27	92,13	154,03	140,90	108,78	87,50	80,21	68,74	51,49	33,41	0,00
FASE 3	0,00	12,17	40,57	62,40	63,42	114,87	103,36	73,31	62,03	41,41	32,73	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	151,61	1,00	0,94	472,89	476,11
FASE 2	154,13	1,50	1,58	517,46	525,73
FASE 3	114,95	2,50	1,77	379,35	400,78

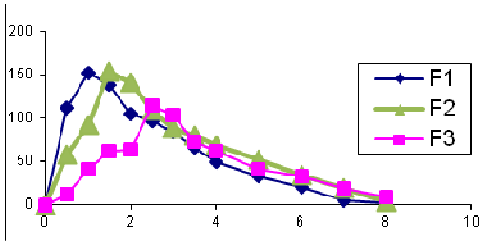

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 5

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	113,19	167,48	138,55	106,58	97,47	84,95	68,44	51,52	33,67	20,23	0,00
FASE 2	0,00	58,70	92,88	175,37	152,88	110,11	89,18	80,69	70,91	52,71	33,96	0,00
FASE 3	0,00	14,27	41,59	63,49	65,15	116,21	105,06	74,51	63,73	43,41	33,75	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	167,59	1,00	1,02	489,27	493,26
FASE 2	175,49	1,50	1,69	543,96	559,36
FASE 3	116,28	2,50	1,86	391,09	417,59

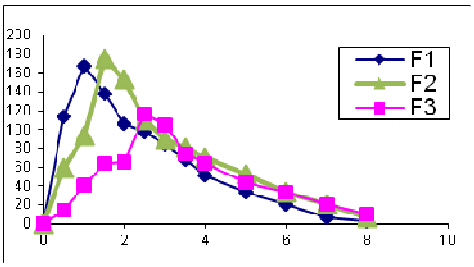

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 6

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	111,45	160,77	138,15	105,01	96,39	84,30	66,77	50,37	32,61	20,51	0,00
FASE 2	0,00	56,91	92,48	156,73	149,18	108,62	86,84	80,19	69,63	52,22	32,07	0,00
FASE 3	0,00	12,35	41,19	62,32	63,51	114,69	103,69	73,14	61,90	42,28	32,40	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	160,88	1,00	0,88	478,52	481,32
FASE 2	156,83	1,50	1,46	522,35	536,06
FASE 3	114,77	2,50	1,81	380,71	403,04

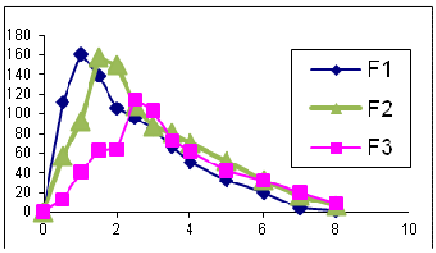

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 7

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO (ng.mL^{-1})											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	109,91	143,44	136,68	103,90	93,52	81,58	64,58	48,63	31,15	17,08	0,00
FASE 2	0,00	55,55	90,65	146,65	135,66	106,50	85,50	78,58	67,06	50,12	30,86	0,00
FASE 3	0,00	11,51	39,66	60,88	63,29	113,18	102,37	71,77	60,39	40,63	34,12	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} (ng.mL^{-1})	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})	$AUC_{0-\alpha}$ (ng.h.mL^{-1})
FASE 1	143,54	1,00	0,81	456,85	459,83
FASE 2	146,75	1,50	1,57	501,30	511,56
FASE 3	113,25	2,50	1,69	372,58	388,72

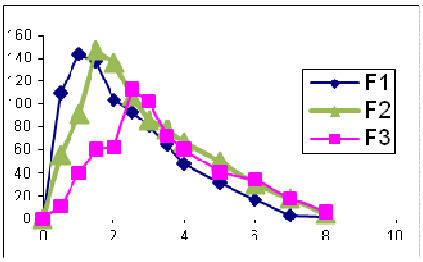

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 8

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO (ng.mL^{-1})											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	110,70	141,64	136,16	103,57	94,29	81,68	64,40	47,65	30,37	18,82	0,00
FASE 2	0,00	55,55	91,12	136,13	149,12	107,22	89,33	78,84	67,04	50,52	32,16	0,00
FASE 3	0,00	10,61	39,66	60,74	62,36	113,48	102,31	72,39	59,68	40,82	34,07	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} (ng.mL^{-1})	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})	$AUC_{0-\alpha}$ (ng.h.mL^{-1})
FASE 1	141,74	1,00	0,78	455,78	458,15
FASE 2	149,22	2,00	1,54	505,29	509,46
FASE 3	113,56	2,50	1,74	372,17	389,48

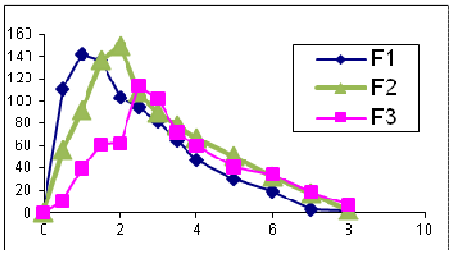

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 9

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	111,85	157,78	137,94	104,38	96,34	84,04	66,68	49,09	32,84	18,70	0,00
FASE 2	0,00	56,14	91,51	155,40	150,80	108,78	87,33	80,40	69,06	50,71	33,20	0,00
FASE 3	0,00	11,81	40,67	62,27	63,49	113,66	102,91	72,54	62,14	42,40	32,93	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	157,89	1,00	0,92	474,51	477,68
FASE 2	155,50	1,50	1,63	522,89	534,32
FASE 3	113,74	2,50	1,74	378,78	399,44

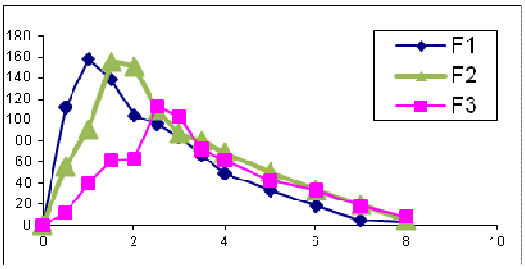

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 10

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	110,66	145,05	136,69	103,65	94,73	82,58	65,00	44,70	31,08	18,35	0,00
FASE 2	0,00	55,62	91,17	140,09	135,63	107,13	86,01	78,51	68,53	50,71	31,68	0,00
FASE 3	0,00	11,12	39,45	60,65	62,04	113,28	102,52	71,27	59,99	40,36	31,11	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	145,14	1,00	0,84	456,69	457,91
FASE 2	140,19	1,50	1,54	500,43	506,70
FASE 3	113,35	2,50	1,72	368,02	384,23

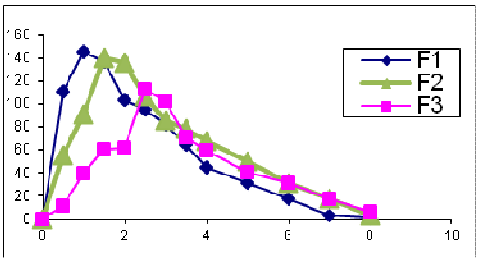

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 11

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	113,38	176,91	139,58	105,93	97,55	85,46	67,65	51,84	33,89	21,44	0,00
FASE 2	0,00	58,70	93,88	173,85	164,35	110,44	89,20	81,93	71,31	53,56	34,63	0,00
FASE 3	0,00	14,20	42,23	63,62	65,85	116,36	105,09	74,73	63,68	43,56	34,14	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	177,03	1,00	1,04	496,78	502,69
FASE 2	173,97	1,50	1,66	551,61	566,36
FASE 3	116,44	2,50	1,86	392,61	419,46

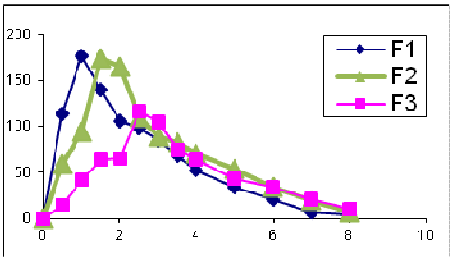

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 12

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	112,10	146,40	137,94	105,33	96,48	84,30	65,70	50,37	32,75	20,05	0,00
FASE 2	0,00	57,13	92,41	161,66	137,23	108,56	87,85	79,32	69,64	50,72	33,32	0,00
FASE 3	0,00	12,74	41,10	61,06	64,44	114,42	103,76	73,73	62,29	42,40	33,09	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	146,49	1,00	0,94	472,55	478,11
FASE 2	161,77	1,50	1,54	519,03	529,28
FASE 3	114,50	2,50	1,80	381,98	404,13

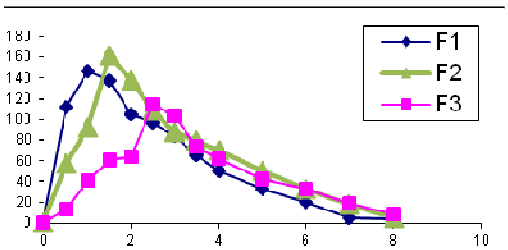

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 13

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	109,20	143,43	133,31	105,26	90,61	80,01	62,48	47,00	29,67	20,20	0,00
FASE 2	0,00	53,87	89,73	133,64	131,71	105,96	84,98	77,35	66,85	49,07	30,72	0,00
FASE 3	0,00	10,02	38,36	59,64	60,52	112,11	101,26	71,05	59,47	39,66	29,18	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	143,53	1,00	0,68	450,74	452,68
FASE 2	133,73	1,50	1,59	488,38	494,70
FASE 3	112,18	2,50	1,55	358,44	370,60

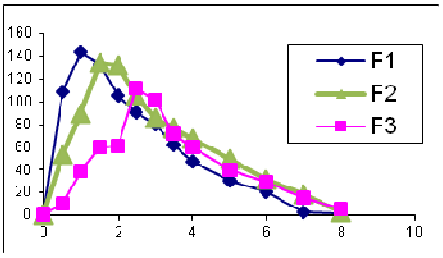

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 14

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	113,89	164,30	139,73	107,03	97,03	86,14	68,48	51,68	33,04	20,23	0,00
FASE 2	0,00	58,88	94,03	176,87	167,70	110,63	89,34	82,13	71,25	52,25	34,99	0,00
FASE 3	0,00	14,43	41,47	63,78	64,70	116,16	104,27	74,14	62,91	42,46	33,29	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	164,41	1,00	0,93	487,56	491,20
FASE 2	176,99	1,50	1,64	553,41	565,37
FASE 3	116,24	2,50	1,90	388,73	416,14

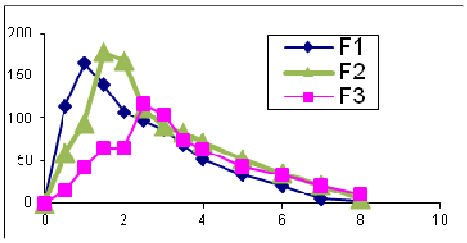

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 15

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	114,60	180,46	141,36	108,51	99,84	86,21	70,02	52,80	34,43	21,83	0,00
FASE 2	0,00	60,26	95,29	190,59	183,17	111,35	90,94	82,45	74,59	53,77	33,57	0,00
FASE 3	0,00	14,74	43,81	65,02	67,45	117,24	106,27	76,13	65,30	43,72	35,54	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	180,58	1,00	1,04	506,04	512,48
FASE 2	190,71	1,50	1,72	576,99	596,94
FASE 3	117,32	2,50	1,95	402,00	433,86

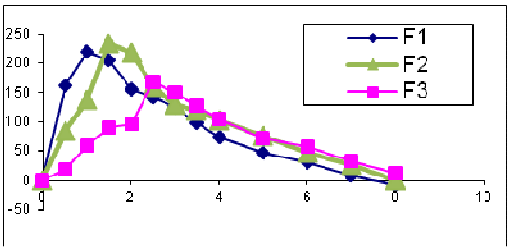

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 16

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	113,57	177,55	139,23	107,03	97,89	85,97	68,48	51,76	32,89	21,96	0,00
FASE 2	0,00	58,87	94,01	176,87	155,76	110,39	89,34	80,70	71,47	52,29	33,57	0,00
FASE 3	0,00	13,30	42,53	63,49	66,08	116,23	104,06	74,75	63,84	43,70	34,33	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	177,67	1,00	0,93	495,67	499,14
FASE 2	176,99	1,50	1,52	544,28	558,91
FASE 3	116,30	2,50	1,87	392,20	418,14

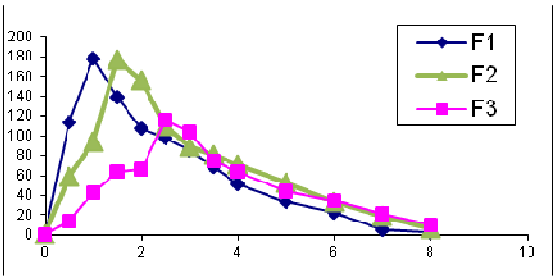

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 17

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	111,94	145,05	138,29	105,56	96,48	83,36	66,77	48,95	31,47	20,20	0,00
FASE 2	0,00	57,29	92,56	122,52	136,01	109,02	88,00	80,52	69,92	52,05	32,21	0,00
FASE 3	0,00	13,11	39,96	62,30	64,46	114,56	103,71	72,77	62,23	42,40	35,66	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	145,14	1,00	0,83	467,74	470,98
FASE 2	136,10	2,00	1,53	500,44	511,36
FASE 3	114,63	2,50	1,80	384,28	406,26

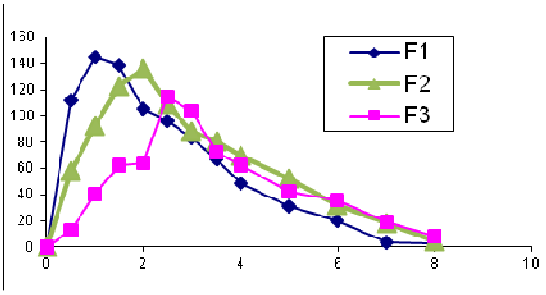

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 18

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	111,85	143,27	137,38	105,26	96,30	84,39	65,87	50,37	32,73	21,66	0,00
FASE 2	0,00	57,12	91,54	163,15	166,64	109,01	89,81	79,25	68,80	52,12	33,49	0,00
FASE 3	0,00	12,95	40,24	62,40	64,58	114,86	102,84	72,42	62,22	42,40	35,67	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	143,37	1,00	0,94	471,40	474,89
FASE 2	166,75	2,00	1,64	537,63	548,93
FASE 3	114,93	2,50	1,79	383,39	402,77

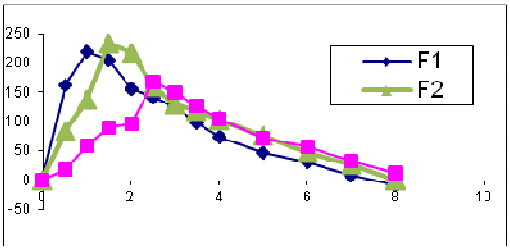

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 19

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	108,09	146,39	134,97	103,03	92,00	80,16	62,48	47,24	29,67	15,47	0,00
FASE 2	0,00	54,13	89,81	122,57	131,40	106,08	83,93	77,35	66,78	47,85	29,34	0,00
FASE 3	0,00	9,01	38,45	59,57	61,89	111,98	100,30	70,92	58,18	39,80	30,38	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	146,49	1,00	0,52	445,08	445,73
FASE 2	131,49	2,00	1,48	477,60	481,72
FASE 3	112,06	2,50	1,67	359,72	373,41

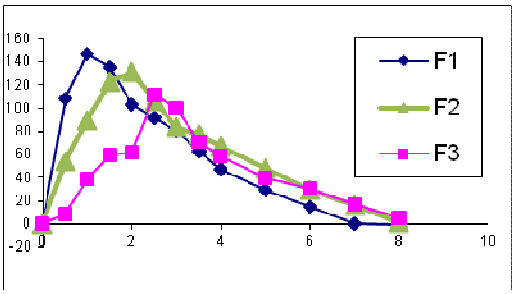

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 20

Tabela Concentrações plasmáticas de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	3,5h	4 h	5 h	6 h	7 h
FASE 1	0,00	109,31	143,44	134,74	104,19	92,18	80,33	62,39	44,60	29,53	17,36	0,00
FASE 2	0,00	54,16	89,84	122,57	134,04	104,94	84,93	76,96	66,79	47,86	30,64	0,00
FASE 3	0,00	9,94	37,12	59,43	60,66	110,92	100,27	70,11	58,34	38,65	30,41	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	143,53	1,00	0,68	445,85	447,95
FASE 2	134,13	2,00	1,40	479,38	485,76
FASE 3	111,00	2,50	1,47	354,36	366,58

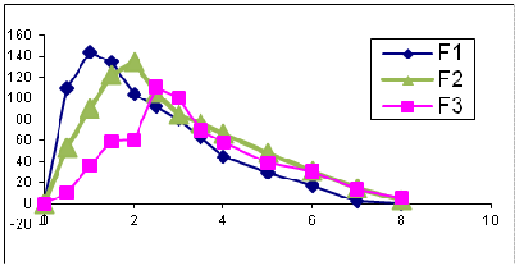

Figura Curvas de decaimento plasmático de (R)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

ANEXO F

Curvas de decaimento plasmático e parâmetros farmacocinéticos individuais para (S)-metoprolol

VOLUNTÁRIO 1

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	93,76	124,54	114,13	92,28	83,18	70,38	57,00	43,57	29,70	18,26	0,00
FASE 2	0,00	47,59	79,82	135,68	125,53	92,41	73,79	67,82	59,12	42,47	27,47	0,00
FASE 3	0,00	10,18	34,21	52,29	55,77	97,39	86,78	72,93	61,09	42,26	33,00	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	124,62	1,00	1,00	405,24	408,79
FASE 2	135,77	1,50	1,52	442,41	449,07
FASE 3	97,45	2,50	1,83	349,96	372,68

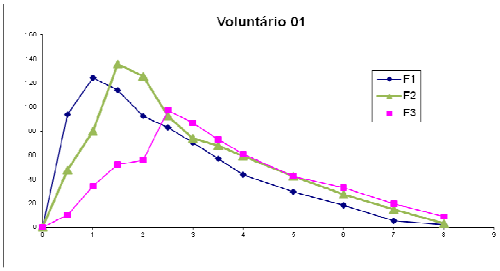

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 2

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	94,34	120,27	111,39	107,39	83,64	69,56	52,06	48,67	30,77	18,77	0,00
FASE 2	0,00	51,96	95,22	156,52	135,10	98,84	71,11	68,40	56,16	44,43	35,68	0,00
FASE 3	0,00	11,79	42,12	64,76	71,23	119,84	110,14	86,32	70,47	55,22	33,13	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	119,92	2,50	2,05	425,53	457,16
FASE 2	156,63	1,50	1,80	479,35	482,40
FASE 3	120,35	1,00	0,77	408,95	412,62

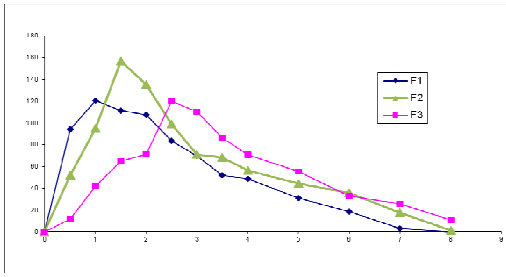

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 3

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	95,83	119,92	109,56	92,86	73,02	67,93	59,58	50,49	28,34	14,03	0,00
FASE 2	0,00	54,65	80,59	124,12	128,79	103,83	72,66	66,69	58,57	41,82	30,53	0,00
FASE 3	0,00	9,51	39,87	56,82	53,98	101,06	108,35	74,00	67,66	44,28	33,24	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	120,00	1,00	0,87	395,01	396,43
FASE 2	128,88	2,00	1,75	450,87	454,88
FASE 3	108,42	3,00	2,04	379,41	407,16

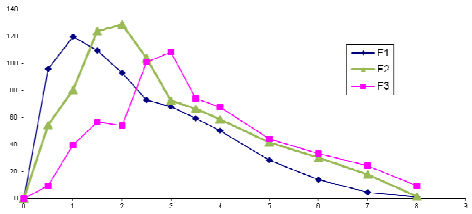

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 4

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	80,30	123,35	90,44	99,90	73,81	72,95	51,60	43,44	29,75	18,41	0,00
FASE 2	0,00	50,06	83,36	125,23	120,26	94,70	80,25	67,88	59,14	45,32	32,52	0,00
FASE 3	0,00	11,99	44,11	55,34	65,61	111,21	108,62	74,59	69,30	43,91	32,41	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	123,43	1,00	0,99	382,39	390,02
FASE 2	125,31	1,50	1,69	450,56	492,92
FASE 3	111,28	2,50	1,58	386,30	401,82

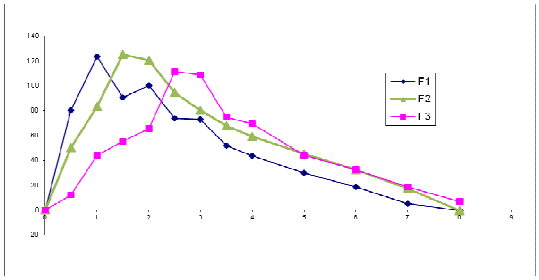

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 5

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO (ng.mL^{-1})											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	83,42	134,62	104,62	103,88	81,54	69,51	63,23	51,35	33,85	19,42	0,00
FASE 2	0,00	53,39	89,03	168,60	123,30	107,77	82,40	69,36	62,46	52,20	33,77	0,00
FASE 3	0,00	14,15	35,83	57,26	58,47	102,00	90,21	77,82	72,35	46,34	44,35	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} (ng.mL^{-1})	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})	$AUC_{0-\alpha}$ (ng.h.mL^{-1})
FASE 1	102,07	2,50	1,97	393,52	423,23
FASE 2	168,71	1,50	1,89	503,17	515,82
FASE 3	134,71	1,00	1,02	421,27	427,40

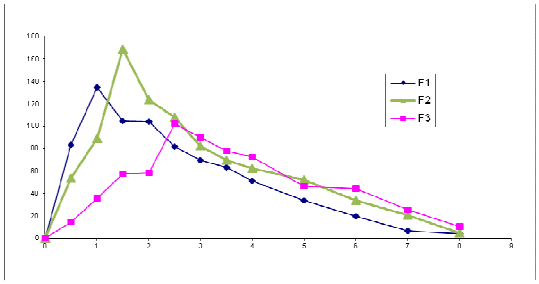

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 6

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO (ng.mL^{-1})											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	105,68	111,56	120,69	93,46	75,67	76,36	65,20	41,80	26,98	12,55	0,00
FASE 2	0,00	47,39	99,72	163,20	112,46	91,00	70,39	60,37	64,64	47,40	33,01	0,00
FASE 3	0,00	9,71	33,38	55,16	54,24	108,33	90,30	94,96	57,70	44,91	37,69	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} (ng.mL^{-1})	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} (ng.h.mL^{-1})	$AUC_{0-\alpha}$ (ng.h.mL^{-1})
FASE 1	120,77	1,50	1,14	403,09	405,94
FASE 2	163,31	1,50	1,75	472,06	476,23
FASE 3	108,41	2,50	2,57	379,39	412,73

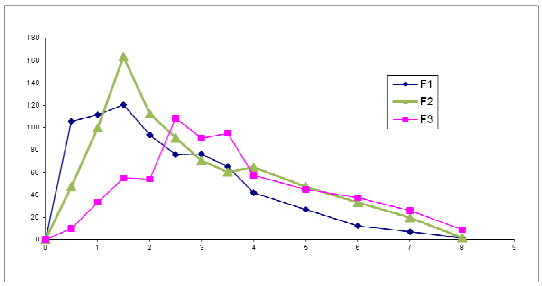

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 7

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	104,87	112,06	118,52	99,41	78,04	57,35	65,08	45,45	28,55	19,54	0,00
FASE 2	0,00	55,96	100,61	151,26	112,08	105,74	71,79	72,35	63,91	36,63	28,76	0,00
FASE 3	0,00	12,82	38,33	51,57	59,18	118,10	88,55	82,11	60,81	44,02	40,49	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	118,60	1,50	1,02	405,87	414,57
FASE 2	151,36	1,50	1,31	463,48	470,52
FASE 3	118,18	2,50	2,15	381,77	400,22

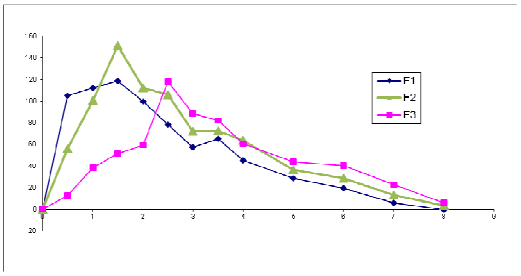

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 8

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	101,84	112,25	120,19	109,34	77,76	70,09	48,61	55,08	33,01	18,43	0,00
FASE 2	0,00	54,04	103,57	144,50	130,56	106,94	74,39	67,39	53,05	50,52	26,95	0,00
FASE 3	0,00	10,77	34,60	58,67	59,09	105,79	89,83	82,59	75,47	45,52	35,59	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	120,27	1,50	1,07	423,47	431,41
FASE 2	144,60	1,50	2,13	479,25	485,58
FASE 3	105,86	2,50	1,58	384,19	408,61

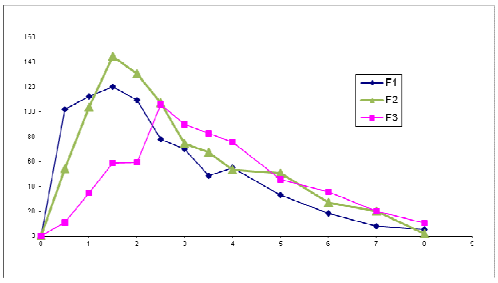

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 9

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	103,00	130,73	96,62	91,23	73,70	73,33	61,51	41,00	30,98	17,76	0,00
FASE 2	0,00	53,37	98,72	122,06	139,57	103,79	62,62	69,62	65,34	34,72	28,67	0,00
FASE 3	0,00	10,25	42,81	50,94	61,78	103,58	87,31	75,05	67,73	43,93	31,53	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	130,82	1,00	0,82	398,73	402,64
FASE 2	139,66	2,00	1,58	454,45	494,21
FASE 3	103,65	2,50	1,77	365,56	377,35

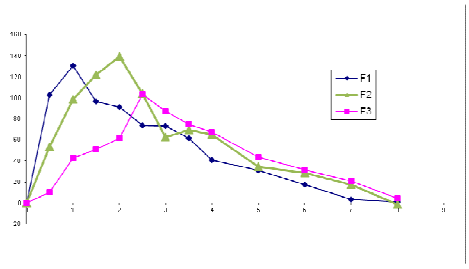

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 10

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	104,32	130,48	102,05	82,74	79,02	64,84	63,21	39,58	30,56	17,75	0,00
FASE 2	0,00	51,66	77,71	121,13	121,67	97,47	83,40	55,16	59,28	34,86	34,78	0,00
FASE 3	0,00	12,79	38,48	59,30	66,96	96,76	80,84	82,61	74,09	47,78	34,34	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	130,57	1,00	0,68	394,23	395,77
FASE 2	121,75	2,00	1,51	435,56	445,02
FASE 3	96,82	2,50	1,73	383,03	402,58

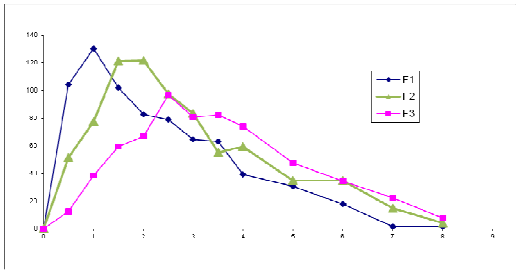

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 11

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	93,95	125,50	114,79	93,38	84,77	70,83	57,94	44,77	30,02	19,14	0,00
FASE 2	0,00	49,30	80,63	144,39	127,64	93,34	76,18	68,70	59,74	44,21	28,31	0,00
FASE 3	0,00	10,97	35,09	53,14	56,90	99,48	87,07	73,96	63,01	42,64	33,37	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	125,59	1,00	1,03	410,09	418,82
FASE 2	144,49	1,50	1,60	456,21	466,47
FASE 3	99,55	2,50	1,80	356,17	379,42

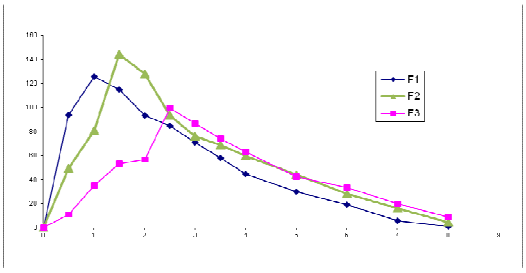

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 12

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	92,64	118,43	109,19	105,31	82,18	67,53	51,25	48,32	28,31	16,19	0,00
FASE 2	0,00	50,60	93,43	145,10	133,24	96,55	68,59	65,53	54,03	42,26	34,08	0,00
FASE 3	0,00	9,75	39,59	62,33	68,61	118,08	107,93	84,80	67,31	52,40	30,77	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	118,51	1,00	0,72	396,37	399,20
FASE 2	145,20	1,50	1,71	460,20	462,76
FASE 3	118,16	2,50	1,88	405,74	427,25

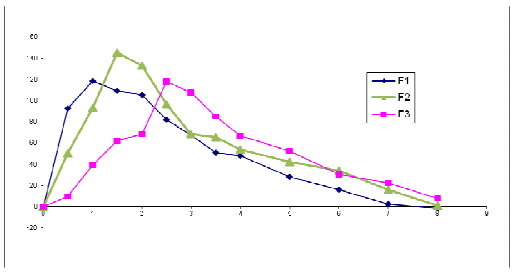

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 13

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	95,95	119,74	109,32	91,91	71,86	66,88	60,25	50,78	27,51	13,39	0,00
FASE 2	0,00	53,41	80,73	123,42	127,91	103,49	71,74	65,78	58,58	41,77	30,57	0,00
FASE 3	0,00	9,28	39,19	56,45	54,22	100,21	108,04	73,80	66,64	43,63	32,74	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	119,82	1,00	0,89	393,41	396,86
FASE 2	127,99	2,00	1,76	449,06	455,57
FASE 3	108,11	3,00	2,07	375,66	399,71

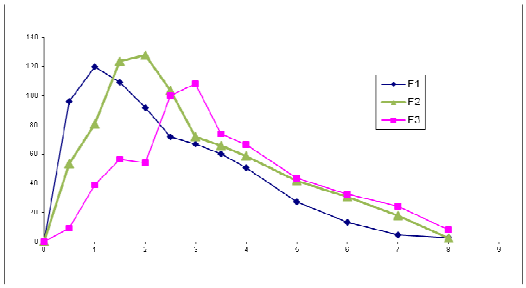

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 14

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	81,86	125,03	92,81	102,35	75,42	74,54	52,99	44,72	30,78	19,82	0,00
FASE 2	0,00	52,52	85,03	125,46	121,83	97,33	81,82	69,66	61,82	47,13	35,82	0,00
FASE 3	0,00	13,69	46,35	57,20	66,81	112,77	110,35	75,34	66,65	45,43	33,86	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	112,84	2,50	1,74	394,91	414,49
FASE 2	125,54	1,50	1,68	464,42	507,86
FASE 3	125,11	1,00	1,15	394,35	406,48

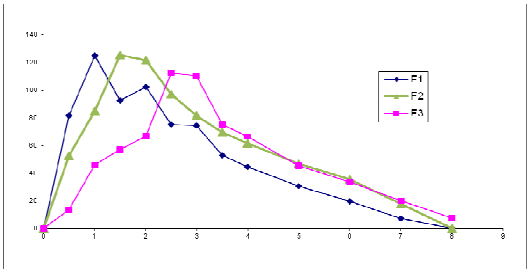

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 15

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	84,58	136,77	106,96	104,97	81,76	70,97	64,67	52,31	34,28	19,70	0,00
FASE 2	0,00	54,74	89,31	183,97	124,99	109,62	82,76	71,11	62,79	52,73	34,19	0,00
FASE 3	0,00	15,94	37,20	57,58	60,00	103,70	91,35	80,04	73,89	47,75	45,84	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	103,77	2,50	2,06	404,94	439,65
FASE 2	184,09	1,50	1,90	515,91	528,76
FASE 3	136,86	1,00	1,18	430,66	440,41

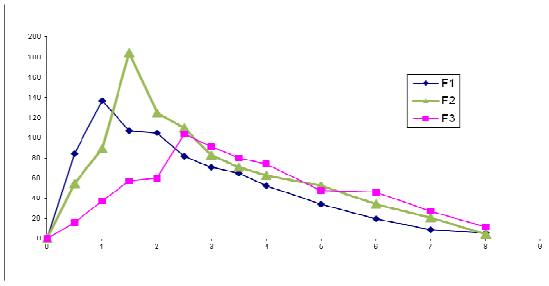

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 16

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	107,09	112,88	123,51	95,40	77,14	78,43	66,84	43,20	29,27	14,55	0,00
FASE 2	0,00	48,70	102,94	186,98	114,20	92,87	73,05	62,65	66,36	50,37	34,67	0,00
FASE 3	0,00	11,23	34,77	56,48	54,57	109,02	92,74	96,40	58,23	45,05	39,80	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	123,59	1,50	1,33	418,37	426,73
FASE 2	187,10	1,50	1,91	500,02	510,18
FASE 3	109,09	2,50	2,61	387,81	426,59

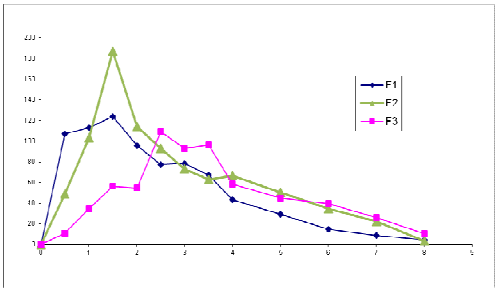

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 17

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	104,37	113,13	119,73	99,41	77,85	57,60	64,15	44,26	31,50	19,34	0,00
FASE 2	0,00	54,91	101,52	148,09	111,93	105,73	72,65	72,06	63,72	39,06	28,94	0,00
FASE 3	0,00	12,84	38,35	52,27	58,97	118,44	89,35	81,71	61,38	44,69	40,84	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	119,81	1,50	1,05	408,58	417,79
FASE 2	148,19	1,50	1,31	464,78	473,00
FASE 3	118,52	2,50	2,08	383,17	399,81

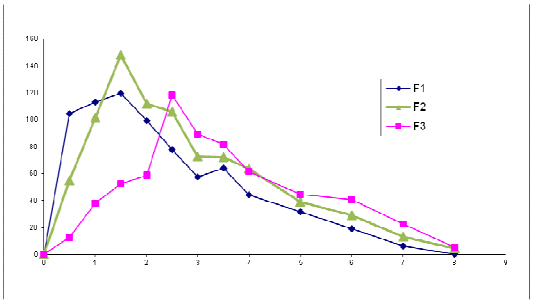

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 18

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	103,64	114,96	122,86	110,01	79,83	70,55	50,16	56,73	33,04	20,01	0,00
FASE 2	0,00	55,98	103,62	163,25	133,43	109,64	74,70	69,75	53,19	52,53	28,55	0,00
FASE 3	0,00	13,37	36,62	58,93	61,54	107,93	92,20	83,82	76,83	47,06	36,13	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	122,94	1,50	1,16	434,69	446,10
FASE 2	163,36	1,50	2,34	500,59	515,60
FASE 3	108,00	2,50	1,63	396,25	427,19

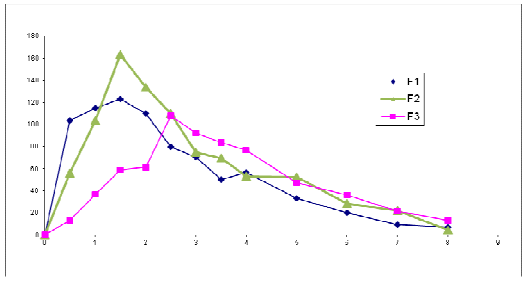

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 19

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	102,50	130,48	95,92	89,71	72,31	71,38	59,95	40,60	30,16	16,08	0,00
FASE 2	0,00	51,17	97,57	119,45	136,88	102,92	61,73	67,98	63,88	33,02	26,97	0,00
FASE 3	0,00	8,40	42,23	52,39	60,26	101,90	86,17	73,47	66,08	42,92	30,57	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	130,57	1,00	0,53	389,35	401,60
FASE 2	136,97	2,00	1,53	443,63	479,97
FASE 3	101,96	2,50	1,57	355,02	363,17

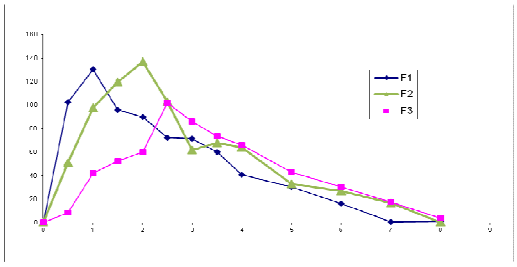

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

VOLUNTÁRIO 20

Tabela Concentrações plasmáticas de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	CONCENTRAÇÃO ($ng.mL^{-1}$)											
	0h	**0,5 h**	**1 h**	**1,5 h**	**2 h**	**2,5 h**	**3 h**	**3,5h**	**4 h**	**5 h**	**6 h**	**7 h**
FASE 1	0,00	104,20	129,52	101,36	81,94	76,19	62,20	62,01	38,53	29,76	15,98	0,00
FASE 2	0,00	49,75	77,27	119,63	120,58	96,53	82,72	53,19	58,51	34,31	34,11	0,00
FASE 3	0,00	12,01	36,84	58,53	66,46	96,00	78,98	80,64	72,20	45,89	32,77	0,00

Tabela Parâmetros farmacocinéticos de de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.

	C_{max} ($ng.mL^{-1}$)	T_{max} (h)	$t_{(1/2)\beta}$ (h)	AUC_{0-t} ($ng.h.mL^{-1}$)	$AUC_{0-\alpha}$ ($ng.h.mL^{-1}$)
FASE 1	129,61	1,00	0,62	385,61	399,80
FASE 2	120,66	2,00	1,45	427,92	434,27
FASE 3	96,07	2,50	1,95	376,32	396,88

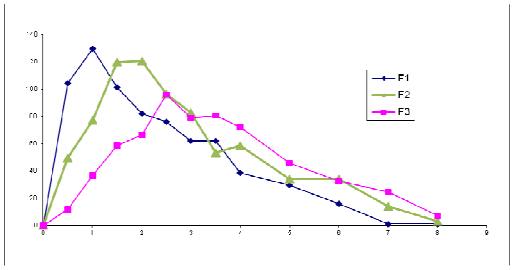

Figura Curvas de decaimento plasmático de (S)-metoprolol, nas fases 1, 2 e 3.