UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS

Estereosseletividade no metabolismo do
metoprolol em pacientes hipertensos portadores
ou não de insuficiência renal crônica

PAULA MACEDO CERQUEIRA

Tese para obtenção do grau de Doutor
Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

São Paulo

-2003-

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES

TOXICOLÓGICAS

**Estereosseletividade no metabolismo do metoprolol
em pacientes hipertensos portadores ou não de
insuficiência renal crônica**

PAULA MACEDO CERQUEIRA

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para concorrer ao título de Doutor pelo curso de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote

SÃO PAULO

-2003-

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005401

Ficha Catalográfica

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

Cerqueira, Paula Macedo

C416e Estereosseletividade no metabolismo do metoprolol em
pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal
crônica / Paula Macedo Cerqueira. -- São Paulo, 2003.
95 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Lanchote, Vera Lucia

1. Metoprolol : Farmacocinética 2. Hipertensão : Medicina
3. Insuficiência renal : Medicina I. T. II. Lanchote, Vera
Lucia, orientador

615.7f CDD

PAULA MACEDO CERQUEIRA

Estereosseletividade no metabolismo do metoprolol em pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica.

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de Doutor

**Profa. Dra. Vera Lucia Lanchote
orientador/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 09 de abril de 2003.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais pelo carinho, por acreditarem e me
incentivarem a seguir este caminho.*

*Às minhas irmãs, Juliana, Roberta e Fábria pela
amizade e a minha sobrinha Maria Luiza por
continuar trazendo tantas alegrias.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vera Lucia Lanchote pelos ensinamentos, pela presença, amizade e confiança.

Ao Dr. Eduardo Barbosa Coelho pela dedicação com os pacientes e conhecimentos que me transmitiu durante todo período de convívio.

Ao Dr. Tufik José Magalhães Geleilete pela luta em conseguir e manter os pacientes no estudo.

À Sandra, Sônia, Neife, Natalino, Cidinha, Eduardo, Profa. Dra. Regina, Prof. Dr. Antônio e alunos do Laboratório de Análises Toxicológicas pela ajuda, pela companhia e troca de experiências que foram de grande valia no desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários da Unidade de Transplante Renal e Enfermaria de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP por nos receber e fornecer todo apoio técnico imprescindível para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas pelo fornecimento dos comprimidos de placebo.

Ao Prof. Wendel L. Nelson pelo fornecimento do padrão de α -hidroximetoprolol e discussão dos espectros de dicroísmo circular.

Aos Profs. Pierina Sueli Bonato, Luis Fernando Lopes Guimarães e Norberto Peporine Lopes pelo auxílio na obtenção e análise dos espectros de dicroísmo circular.

Ao Dr. Oscar Della Pascoa pelas discussões e desenvolvimento da cinética populacional do metoprolol.

A Vanessa pela dedicação e auxílio no desenvolvimento e validação do método de análise do ácido O-desmetilmetoprolóico.

Ao Prof. Walter Vichnewisk pela paciência em corrigir a tese e pelas preciosas sugestões na parte química.

Ao Luciano por me acompanhar na difícil fase final, com incentivo, paciência e carinho e pela rigorosa correção do texto.

A Maria Paula pelo companheirismo durante toda a nossa jornada dentro e fora do HCFMRP-USP.

Aos amigos Adriana, Isis, Wilson, Maria Paula, Vanessa, Caju, Paulo, Fabiano, Olga, Ismar e Giuliano pela alegria de trabalharmos juntos.

Aos docentes e funcionários das Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP que forneceram condições para seguirmos a carreira de pesquisadores.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

RESUMO

I INTRODUÇÃO	1
II OBJETIVOS	10
III CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
1 Casuística e protocolo clínico	13
2 Análise estereosseletiva do metoprolol e seus metabólitos	17
2.1 Soluções-padrão e reagentes	17
2.2 Análise cromatográfica	18
2.3 Preparo das amostras	19
2.3.1 Metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma	19
2.3.2 Metoprolol e α -hidroximetoprolol em urina	19
2.3.3 Ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma	20
2.3.4 Ácido O-desmetilmetoprolólico em urina	20
2.4 Determinação da ordem de eluição dos isômeros	21
2.4.1 Configuração absoluta do α -hidroximetoprolol	21
2.4.2 Configuração absoluta do ácido O-desmetilmetoprolólico	21
2.5 Curvas de calibração	22
2.6 Validação	23
2.6.1 Recuperação	23
2.6.2 Limite de quantificação e linearidade	24
2.6.3 Precisão e exatidão	24
2.6.4 Estabilidade e racemização	25
2.6.5 Seletividade	26
2.6.6 Robustez	26
3 Análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina em urina	26
4 Análise da noradrenalina em plasma	27

5	Análise farmacocinética	28
5.1	Concentração plasmática	28
5.2	Excreção urinária	30
5.3	Fenótipo oxidativo tipo debrisoquina	30
6	Análise estatística	31
IV	RESULTADOS	32
1	Análise Cromatográfica	33
2	Determinação da ordem de eluição dos isômeros	36
3	Validação	38
3.1	Análise estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina	39
3.2	Análise enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina	44
4	Estudo clínico	47
4.1	Teste de debrisoquina	47
4.2	Parâmetros farmacodinâmicos	48
4.2.1	Noradrenalina plasmática	48
4.2.2	Parâmetros cardiovasculares	49
4.3	Metabolismo do metoprolol	52
V	DISCUSSÃO	69
VI	CONCLUSÕES	85
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
SUMMARY		
APÊNDICES		
ANEXO		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo oxidativo do metoprolol no homem	5
Figura 2 - Fluxograma referente ao protocolo clínico dos pacientes investigados	16
Figura 3 - Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros α -hidroximetoprolol em plasma e urina	34
Figura 4 - Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em urina e plasma	35
Figura 5 - Cromatogramas referentes a análise das catecolaminas em plasma	36
Figura 6 - Espectros de DC dos isômeros do α -hidroximetoprolol	37
Figura 7 - Cromatogramas referentes a análise de DC dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico	38
Figura 8 - Frequência de distribuição da razão urinária 0-8 h log debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina nos 15 pacientes investigados	48
Figura 9 - Concentrações plasmáticas de noradrenalina nas diferentes fases do tratamento	49
Figura 10 - Frequência cardíaca dos grupos Controle e IRC nas fases basal e após 200 mg de metoprolol (Fase 3) ou placebo. Média $\pm$ EPM	49
Figura 11 - Curvas de concentração plasmática e frequência cardíaca <i>versus</i> tempo para as fases do protocolo com doses crescentes de metoprolol. Média $\pm$ EPM	51
Figura 12 - Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III). Dados expressos como média e EPM	53
Figura 13 - Curvas de excreção urinária dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e do ácido O-desmetilmetoprolóico (III). Dados representativos dos pacientes MJJC (controle) e BMS (IRC)	54
Figura 14 - Curvas de razões de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo. (I) isômeros do α -hidroximetoprolol/ enantiômeros	

do metoprolol; (II) enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico/ enantiômeros do metoprolol. Dados expressos como média e erro padrão da média	55
Figura 15 - Parâmetros farmacocinéticos que diferem entre os grupos Controle e IRC. Dados expressos como média e EPM	56
Figura 16 - Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do metoprolol (I) e do ácido O-desmetilmetoprolóico (II) (média dos grupo, símbolos cheios) e dos pacientes WGB (Controle) e ILS (IRC) com fenótipo de metabolizadores lentos da debrisoquina (símbolos abertos)	57
Figura 17 - Razões de concentrações plasmáticas S-(-)/R-(+)-metoprolol no intervalo de dose. Curvas médias dos grupo (símbolos cheios) e curvas dos pacientes WGB (Controle) e ILS (IRC) com fenótipo de metabolizadores lentos da debrisoquina (símbolos abertos)	58
Figura 18 - Correlação entre a razão metabólica urinária debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina e a razão de concentração plasmática (3h) metoprolol/ α -hidroximetoprolol. □ metabolizadores lentos (PM); ■ metabolizadores rápidos (EM)	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados individuais dos pacientes investigados (n=15)	14
Tabela 2 –	Limites de confiança para o método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina	40
Tabela 3 –	Estudo da precisão dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol. Precisão intra-ensaio	41
Tabela 4 –	Estudo da precisão dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol. Precisão interensaios	42
Tabela 5 –	Estudo de estabilidade de longa duração dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma	43
Tabela 6 –	Estudo da seletividade dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina	43
Tabela 7 –	Limites de confiança para os métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina	44
Tabela 8 –	Estudo da precisão dos métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico. Precisão intra-ensaio (n=10) e interensaios (n=5)	45
Tabela 9 –	Estudo da seletividade do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina	45
Tabela 10 –	Estudo de estabilidade dos métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina	46
Tabela 11 –	Investigação do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina	47
Tabela 12 –	Concentrações plasmáticas de noradrenalina nas diferentes fases do protocolo clínico. Média (IC 95%)	48
Tabela 13 –	Pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca no período da vigília nas fases Basal e após tratamento com doses múltiplas de metoprolol ou placebo. Médias (IC 95%)	50
Tabela 14 –	Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%) , n=7.	59
Tabela 15 –	Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do	

	metoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%), n=6.	60
Tabela 16 –	Grupo Controle: disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%), n=7.	61
Tabela 17 –	Grupo IRC: disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%), n=6.	62
Tabela 18 –	Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina. Média (IC 95%), n=7.	63
Tabela 19 –	Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina. Média (IC 95%), n=6.	64
Tabela 20 –	Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina no Grupo Controle com fenótipo EM (n=7) e no paciente WGB com fenótipo PM. Média (IC 95%).	65
Tabela 21 –	Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina no Grupo Controle com fenótipo EM (n=7) e no paciente WGB com fenótipo PM. Média (IC 95%).	66
Tabela 22 –	Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina no Grupo IRC com fenótipo EM (n=6) e no paciente ILS com fenótipo PM. Média (IC 95%).	67
Tabela 23 –	Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina no Grupo IRC com fenótipo EM (n=6) e no paciente ILS com fenótipo PM. Média (IC 95%).	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AODM = ácido O-desmetilmetoprolóico

α -OHM = α -hidroximetoprolol

bmp = batimentos por minuto

CYP = citocromo P450

CYP1A1 = citocromo P4501A1

CYP2D6 = citocromo P4502D6

CYP3A = citocromo P4503A

DC = dicroísmo circular

DMR = razão metabólica da debrisoquina

DPBEA = complexo de etanolamina e ácido difenilbórico

DRR = razão de recuperação da debrisoquina

EDTA = ácido etilenodiaminoacético

EGTA = ácido etilenoglicol-bis(éter β -aminoetílico)-N,N,N',N'-tetracético

EM = metabolizador rápido

EPM = erro padrão da média

IC 95% = intervalo de confiança 95%

IRC = insuficiência renal crônica

MAPA = monitor ambulatorial da pressão arterial

PA = pressão arterial

PM = metabolizador lento

p.o. = *per oral*

SDS = dodecilsulfato de sódio

ToABR = brometo de tetraoctilamônio

t_R = tempo de retenção

UM = metabolizador ultra rápido

UV = ultravioleta

v/v = volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

A_e = quantidade excretada na urina

AUC = área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

AUC_{0-24}^{ss} = área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo no intervalo de dose de 24 h

α = constante de velocidade de distribuição

c = concentração plasmática

β = constante de velocidade de eliminação

C_{max} = concentração plasmática máxima

Cl_R = *clearance* renal

Cl_M = *clearance* de formação

Cl_T/f = *clearance* total aparente

C_u = concentração urinária

Fel/f = fração da dose excretado sob forma inalterada

f = biodisponibilidade

K_a = constante de velocidade de absorção

K_{el} = constante de velocidade de eliminação total

t = tempo

$t^{1/2}$ = meia-vida de eliminação total

$t^{1/2}_a$ = meia-vida de absorção

$t^{1/2}_\alpha$ = meia-vida de distribuição

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

t_{max} = tempo para atingir C_{max}

t_{mid} = tempo médio no intervalo de coleta

Vd/f = volume aparente de distribuição

V_u = volume de urina no intervalo de coleta

RESUMO

CERQUEIRA, P.M. **Estereosseletividade no metabolismo do metoprolol em pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica**. 2003. Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste estudo investiga-se a influência da insuficiência renal crônica no metabolismo estereosseletivo do metoprolol administrado sob forma racêmica, em regime de doses múltiplas *p.o.*. Foram investigados 15 pacientes, de ambos os sexos, portadores de hipertensão arterial associada ou não a insuficiência renal crônica (IRC), divididos em dois grupos de acordo com o *clearance* da creatinina. Os pacientes foram fenotipados empregando a debrisoquina como fármaco marcador (CYP2D6), de acordo com a razão metabólica debrisoquina/ 4-hidroxidebrisoquina na urina de 0-8 h. Os pacientes foram tratados com placebo, 50, 100 e 200 mg de tartarato de metoprolol (Seloken®, Astra, São Paulo, Brasil) a cada 24 horas durante 7 dias para cada tratamento. No final de cada semana foi realizada a monitorização ambulatorial da pressão arterial e colhida uma amostra de sangue para dosagem de noradrenalina. No sétimo dia da administração de 200 mg foram colhidas amostras seriadas de sangue e amostras de urina no intervalo de 0-36 h. Os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-metoprolol e os 4 isômeros do α -hidroximetoprolol (coluna Chiralpak® AD) e os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (coluna Chiralcel® OD-R) foram analisados em plasma e urina por cromatografia líquida de alta eficiência empregando detecção por fluorescência (λ_{exc} = 229 nm; λ_{em} = 298 nm). Não houve alteração da concentração plasmática de noradrenalina assim como da pressão arterial sistólica e diastólica nas diferentes fases do tratamento. Em ambos os grupos a frequência cardíaca foi reduzida após administração de 200 mg de metoprolol. Os parâmetros farmacocinéticos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, teste Wilcoxon) entre os enantiômeros (R)-(+)- e (S)-(-)-metoprolol nos grupos Controle e IRC para os pacientes com fenótipo de metabolizadores rápidos da debrisoquina, resultando em acúmulo plasmático do eutômero (S)-(-)-. Houve favorecimento na formação do novo centro quiral 1'R- α -OHM em ambos enantiômeros do metoprolol, resultando em razões 1'R/1'S $\cong$ 2,5 nos dois grupos. Houve um favorecimento na formação do (R)-(+)-AODM nos dois grupos, justificando o acúmulo plasmático do (S)-(-)-metoprolol. Ao compararmos os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos Controle e IRC (teste Mann-Whitney) observamos que a farmacocinética do metoprolol não foi alterada apesar do acúmulo plasmático de todos os isômeros do α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico. Os dois pacientes fenotipados como metabolizadores lentos da debrisoquina não formaram α -hidroximetoprolol e houve um favorecimento na formação do (S)-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico, com

conseqüente acúmulo plasmático do (R)-(+)-metoprolol. As diferenças entre os grupos Controle e IRC na formação dos metabólitos do metoprolol sugerem que a IRC não induz o CYP2D6 mas induz a atividade do outro sistema enzimático responsável pela formação do ácido O-desmetilmetoprolóico.

Palavras-chave: metoprolol, insuficiência renal crônica, hipertensão, farmacocinética, pacientes, enantiômero, CYP2D6.

I INTRODUÇÃO

O conhecimento da estereosseletividade na farmacodinâmica, bem como na disposição cinética e especialmente no metabolismo de fármacos quirais é indispensável para a decisão da comercialização de medicamentos sob a forma de racemato ou de enantiômero puro e para a discussão de variabilidade interindividual na resposta terapêutica^{5,69}.

Uma molécula que tem em sua estrutura um centro assimétrico não possui plano de simetria interno, sendo denominada molécula quiral. Uma molécula com um centro quiral existe como um par de enantiômeros²⁸. Os enantiômeros individuais de um fármaco racêmico, caracterizados por diferentes orientações espaciais, geralmente manifestam efeitos terapêuticos e reações adversas qualitativamente ou quantitativamente diferentes, em razão das exigências conformacionais implícitas no processo de interação dos fármacos com receptores específicos^{53,58,68}.

Os enantiômeros de um fármaco racêmico também podem diferir nas propriedades farmacocinéticas como consequência da interação enantiosseletiva com macromoléculas biológicas. Os processos farmacocinéticos relacionados com transporte passivo através de membranas biológicas, como a absorção no trato gastrointestinal, a distribuição nos tecidos e a filtração glomerular são dependentes das propriedades físico-químicas do fármaco⁵. Considerando que estas propriedades são similares para os dois enantiômeros, exceto as interações com substâncias opticamente ativas, a expressão da enantiosseletividade não é característica desses processos. Observa-se, no entanto, enantiosseletividade na absorção dependente de transportadores, na ligação às proteínas plasmáticas, nas secreções biliar e renal e no metabolismo, uma vez que esses processos implicam na interação do fármaco com macromoléculas quirais⁵.

Dentre os fatores que alteram as razões enantioméricas das concentrações plasmáticas de um fármaco, destaca-se a via de administração. No caso de fármacos de baixa razão de extração hepática, a enantiosseletividade é observada tanto após a administração *per oral* (p.o.)

quanto intravascular, uma vez que as diferenças no *clearance* intrínseco são diretamente refletidas no *clearance* hepático. No caso de fármacos de alta razão de extração hepática, em situações de administração intravascular, o *clearance* hepático é dependente do fluxo de sangue hepático e não do *clearance* intrínseco. Portanto, razões enantioméricas de concentrações plasmáticas diferentes da unidade de fármacos de alta razão de extração hepática são restritas a administração *p.o.*²⁸. O metabolismo de fármacos quirais é reconhecido como o processo capaz de introduzir maior grau de enantiosseletividade na farmacocinética e pode ser manifestado nas reações enzimáticas de fase I e fase II. As reações que levam a produção de metabólitos quirais a partir de fármacos não quirais também são relevantes na discussão da enantiosseletividade no metabolismo⁵.

A administração de racematos resulta, geralmente, em variabilidade interindividual nas razões enantioméricas de concentrações plasmáticas e dificulta tentativas do estabelecimento da correlação concentração/efeito quando são empregados métodos analíticos não enantiosseletivos. As principais causas de variabilidade nas razões enantioméricas incluem a idade, o sexo, os estados patológicos e os fatores genéticos²⁸.

O metoprolol [1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol], antagonista seletivo do receptor β_1 -adrenérgico, é empregado na clínica sob a forma racêmica para o tratamento da angina pectoris e hipertensão²¹. O mecanismo pelo qual os bloqueadores β -adrenérgicos promovem a queda da pressão arterial não é completamente elucidado. O antagonismo de receptores β -adrenérgicos afeta a homeostasia do sistema circulatório através de vários mecanismos, incluindo a redução na contratilidade miocárdica e no débito cardíaco. Outra consequência importante deste bloqueio é a redução da secreção de renina, com resultante queda nos níveis plasmáticos de angiotensina II, cujos efeitos no controle circulatório e na secreção de aldosterona, contribuem de forma importante para a ação anti-hipertensiva

desta classe de fármacos. Alguns efeitos dos bloqueadores β -adrenérgicos, sobretudo em altas doses, não parecem ser dependentes da renina. Vários mecanismos foram propostos como responsáveis pela redução não-renina-dependente da pressão arterial, incluindo a alteração da atividade eferente simpática, a alteração da sensibilidade dos barorreceptores, a alteração na neurotransmissão nos neurônios pré e pós-ganglionares simpáticos e o aumento na síntese de prostaciclina²¹.

O metoprolol apresenta um átomo de carbono assimétrico em sua estrutura química, e o enantiômero (S)-(-)-metoprolol é o que expressa maior atividade no bloqueio do receptor β_1 -adrenérgico^{21,71}. A maioria dos dados da literatura relativos a enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol são obtidos de estudos de administração de dose única a voluntários sadios^{30,31,37}. Um estudo realizado com administração de doses múltiplas, em pacientes hipertensos, mostrou haver enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol com acúmulo plasmático do eutômero (S)-(-)-metoprolol e favorecimento da excreção renal do seu antípoda (R)-(+)^{8,9}.

A excreção renal do metoprolol inalterado é inferior a 10%, indicando o metabolismo como o principal processo responsável pela sua eliminação⁵⁷. Os metabólitos do metoprolol (Figura 1) são gerados por hidroxilação alifática (α -hidroximetoprolol, $\cong 10\%$), desaminação oxidativa (N-desalquilmetoprolol, $<10\%$) e O-desalquilação (O-desmetilmetoprolol, $\cong 65\%$) com subsequente oxidação (ácido O-desmetilmetoprolóico)⁷. Os metabólitos α -hidroximetoprolol e O-desmetilmetoprolol apresentam aproximadamente 1/10 da atividade do metoprolol e são considerados pouco significativos na contribuição do efeito farmacológico em razão das baixas concentrações plasmáticas^{7,21}.

Figura 1 – Metabolismo oxidativo do metoprolol no homem^{7,46}

O metoprolol é eliminado por metabolismo oxidativo com envolvimento de diferentes enzimas citocromo P450 (CYP), sendo o CYP2D6 responsável por biotransformar aproximadamente 70% do metoprolol *in vivo*³⁰. Em microsomas de fígado humano, a α -hidroxilação é catalisada essencialmente pela forma polimórfica CYP2D6, enquanto a formação do O-desmetilmetoprolol é parcialmente dependente desta enzima. Outras enzimas, incluindo o CYP3A, estão envolvidas na O-desmetilação do metoprolol e diferem do CYP2D6 pela regiosseletividade aos substratos e por serem resistentes à inibição da quinidina^{46,54}.

Em microsomas de fígado humano a oxidação do (R)-(+)-metoprolol resulta preferencialmente na formação do O-desmetilmetoprolol, enquanto a oxidação do (S)-(-)-metoprolol resulta no favorecimento da α -hidroxilação^{47,54}. A hidroxilação na cadeia alifática do metoprolol adiciona um novo centro quiral no correspondente α -hidroximetoprolol gerando quatro isômeros ópticos. Em um estudo clínico com voluntários sadios metabolizadores rápidos da debrisoquina, Murthy et al. (1990)⁵² observaram, através da recuperação urinária do metoprolol e seus metabólitos, a formação preferencial do novo centro quiral 1'R em relação ao 1'S- α -hidroximetoprolol ($1'R/1'S \cong 3$) após tratamento com dose única oral de metoprolol racêmico. Os autores também observaram enantioseletividade na formação do ácido O-desmetilmetoprolóico, com favorecimento do enantiômero (R)-(+)-, confirmando os resultados obtidos em microsomas de fígado humano⁵².

Devido às diferenças genéticas, aproximadamente 7% da população caucasiana e 1,0% da população chinesa não expressam ou expressam baixa atividade do CYP2D6⁶ (metabolizador lento, PM) e, conseqüentemente manifestam altas concentrações plasmáticas do metoprolol nas doses terapêuticas, enquanto, no outro extremo, 30% da população norte africana² e 1% dos caucasianos da Suécia^{16,29} apresentam multiplicação de genes do CYP2D6 levando a metabolização ultra-rápida do metoprolol e outros

substratos com metabolismo dependente desta enzima (metabolizador ultra-rápido, UM).

A debrisoquina, fármaco anti-hipertensivo, tem sido empregada como marcador da atividade do CYP2D6 desde que esta enzima foi identificada como polimórfica⁶⁷. A debrisoquina é eliminada principalmente por metabolismo oxidativo, resultando na formação da 4-hidroxi-debrisoquina, dos metabólitos fenólicos 5-, 6-, 7- e 8-hidroxi-debrisoquina, assim como traços de compostos difenólicos e outros metabólitos²⁰. Em metabolizadores rápidos (EM) 30% da dose de debrisoquina é excretada na urina como 4-hidroxi-debrisoquina. Acreditava-se que a formação da 4-hidroxi-debrisoquina era mediada exclusivamente via CYP2D6⁶⁷, no entanto recentemente a 4-hidroxiilação da debrisoquina também foi demonstrada como um processo dependente do CYP1A1 em microsomas de linfoblastos humanos²⁰. Em humanos, o CYP1A1 é encontrado no intestino delgado, em células epiteliais dos brônquios e na placenta, portanto o metabolismo pré-sistêmico da debrisoquina é principalmente mediado pelo CYP2D6 hepático, com alguma contribuição do CYP1A1 intestinal²⁰. Devido a esta característica, a debrisoquina é empregada como fármaco marcador da atividade do CYP2D6 *in vivo*, que pode ser estimada pela razão de recuperação da debrisoquina ($DRR = \frac{\text{4-hidroxi-debrisoquina}}{\text{debrisoquina} + \text{4-hidroxi-debrisoquina}}$) ou pela razão metabólica ($DMR = \frac{\text{debrisoquina}}{\text{4-hidroxi-debrisoquina}}$) na urina coletada 6-8 h após a administração de uma única dose *p.o.* de debrisoquina⁶⁷. A razão metabólica varia na população de $\cong 0,01$ a >100 , sendo que indivíduos que expressam $DMR < 12,6$ são fenotipados como metabolizadores rápidos ou ultra-rápidos ($DMR < 0,2$)⁶⁷. Uma razão de recuperação (DRR) maior que 0,12 também expressa o fenótipo de metabolizador rápido da debrisoquina³³.

Além do fenótipo oxidativo, a enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol administrado por via *p.o.* em indivíduos com fenótipo de metabolizador rápido tem alta relevância na alta variabilidade interindividual

exibida na disposição cinética deste fármaco^{9,31,39,41}. A observação de ausência de enantiosseletividade na administração intravascular do metoprolol a voluntários sadios foi reportada por Leemann et al. (1993)³⁷. Consequentemente, a enantiosseletividade na disposição cinética do metoprolol é resultante da discriminação entre os enantiômeros na eliminação pré-sistêmica após administração *p.o.*.

A identificação dos fatores responsáveis por concentrações plasmáticas com razões enantioméricas diferentes da unidade contribui na definição das origens de variabilidade individual na resposta aos fármacos empregados na terapêutica. Os fatores genéticos são reconhecidos como preponderantes, por outro lado, a influência de doenças na estereosseletividade é surpreendentemente pouco investigada.

Os pacientes com a função renal reduzida podem apresentar respostas inesperadas a doses terapêuticas de muitos fármacos. Esta resposta é normalmente resultante de alterações na distribuição, metabolismo ou excreção renal. A principal alteração farmacocinética na insuficiência renal é certamente a redução na excreção renal, com observação de redução no *clearance* renal e acúmulo plasmático principalmente de fármacos com alta fração eliminada (*F_{el}*) na urina sob a forma inalterada. Há um aumento no volume de distribuição dos fármacos hidrofílicos devido à retenção de líquidos. Um fator de grande importância na determinação do volume de distribuição é a ligação às proteínas plasmáticas, que pode ser alterada principalmente para fármacos de caráter ácido. Ocorre uma redução na ligação à albumina devido à retenção de substâncias endógenas que competem pelo sítio de ligação⁷⁰. O metabolismo pode ser alterado nesta patologia, podendo estar induzido ou inibido. As reações de hidrólise e acetilação são amplamente reduzidas e a conjugação com o ácido glicurônico e sulfato pode estar normal ou reduzida. As reações de oxidação podem ser afetadas de diferentes formas, podendo estar reduzidas, normais ou até induzidas^{60,70}. Em um trabalho de

investigação de pacientes hipertensos com insuficiência renal foi demonstrado um aumento considerável nos *clearances* da antipirina e nifedipina por indução do CYP3A³⁵.

A insuficiência renal não altera a meia-vida de eliminação e o *clearance* total do metoprolol, devido a baixa excreção renal (10%) e baixa ligação às proteínas plasmáticas (12%)²⁵. Estudos não estereosseletivos evidenciam que a insuficiência renal crônica resulta em prolongamento da meia-vida de eliminação e acúmulo plasmático do metabólito ativo α -hidroximetoprolol e dos metabólitos totais²⁵. Não há dados relativos a influência da insuficiência renal crônica nas vias individuais de metabolismo do metoprolol, ou seja, os *clearances* de formação dos metabólitos não foram até então investigados.

O presente estudo visa investigar a estereosseletividade nas principais vias de metabolismo do metoprolol, administrado sob forma racêmica em regime de doses múltiplas *p.o.*, a pacientes hipertensos com função renal dentro dos limites da normalidade e pacientes hipertensos portadores de insuficiência renal crônica.

II OBJETIVOS

Investigar a influência da insuficiência renal crônica no metabolismo estereosseletivo do metoprolol em pacientes hipertensos.

Constituem os principais objetivos específicos:

- ✿ Desenvolver e validar métodos estereosseletivos de análise do α -hidroximetoprolol e do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina.
- ✿ Investigar a atividade *in vivo* do CYP2D6 em pacientes hipertensos empregando a debrisoquina como fármaco marcador.
- ✿ Investigar a estereosseletividade na disposição cinética e metabolismo do metoprolol em pacientes hipertensos com função renal normal.
- ✿ Investigar a estereosseletividade na disposição cinética e metabolismo do metoprolol em pacientes hipertensos portadores de insuficiência renal crônica.
- ✿ Avaliar parâmetros farmacodinâmicos na administração de doses múltiplas *p.o.* do metoprolol racêmico em pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica.

III CASUÍSTICA E MÉTODOS

1 Casuística e Protocolo Clínico

O protocolo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP, Proc. nº 7366/98, Apêndice 1). Foram investigados 15 pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica primária ($> 140 \times 90$ mmHg em três aferições basais em dias distintos), sendo 7 destes portadores de insuficiência renal crônica secundária a nefropatia hipertensiva (**Grupo IRC**; *clearance* da creatinina < 60 mL/min) e 8 apresentando função renal dentro dos limites da normalidade (**Grupo Controle**; *clearance* da creatinina > 70 mL/min) em seguimento na Clínica de Hipertensão Arterial do HC-FMRP-USP. Foram excluídos da investigação pacientes das raças negra e amarela. Os dados individuais dos pacientes investigados encontram-se na TABELA 1. Os pacientes foram incluídos no estudo após obtenção do Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) depois de receberem explicação detalhada dos procedimentos e comprovação da normalidade das funções hepática e cardíaca através de exames clínicos e dados laboratoriais (Apêndice 3).

Para investigação do fenótipo oxidativo do CYP2D6 os pacientes fizeram o teste da debrisoquina antes de iniciarem o protocolo do metoprolol. Após jejum de 12 h e esvaziamento da bexiga, os pacientes tomaram 10 mg de sulfato de debrisoquina (Debrisoquine®, Cambridge Laboratories, Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra, lote DEA 384, validade 10/2002) com 200 mL de água. A urina foi colhida durante 8 horas após a administração do fármaco, o volume medido e uma alíquota de 10 mL armazenada a -20°C .

Os pacientes iniciaram o protocolo do metoprolol com 7 dias de *wash out* (período em que não foram administrados fármacos anti-hipertensivos ou inibidores do CYP2D6). No sétimo dia foi instalado o Medidor Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA) com programação para realizar medidas de pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca a cada 15 min

durante o período da vigília e a cada 30 min durante o período do sono durante 24 h (**Fase Basal**). A metade dos pacientes de cada grupo iniciou a investigação recebendo 50 mg de tartarato de metoprolol racêmico (Seloken®, Asta, Brasil, lote P.2028) na primeira semana (**Fase 1**) e 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico na semana subsequente (**Fase 2**). Ao final de cada semana foi realizada a MAPA nas mesmas condições da Fase Basal e foram colhidas amostras de sangue no vale (imediatamente antes da administração) e no pico de concentrações plasmáticas do medicamento (90 min após a administração).

TABELA 1- Dados individuais dos pacientes investigados (n=15)

Paciente (sexo)	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (cm)	Cl _{CR} (mL/min)	Medicamentos associados
Grupo IRC					
LSS (M)	53	83,5	160	48,0	--
BMS (M)	57	80,0	159	51,5	--
ALR (M)	59	78,8	171	25,8	sinvastatina clobazam
MDSM (F)	51	79,0	162	51,0	--
BAS (F)	63	102,0		39,3	sinvastatina bezafibrato
JCG (M)	54	98,8	170	59,8	--
ILS (F)	62	69,0	172	37,4	--
Grupo Controle					
JLC (M)	47	80,0	174	82,0	--
MJJC (F)	50	92,9	156	123,4	--
LAM (M)	46	95,4	175	90,0	--
WGB (M)	54	94,1	163	124,9	--
MASD (F)	64	72,5	156	71,2	diazepam
CSB (F)	42	91,7	162	87,0	--
CAS (M)	57	107,0	187	112,1	--
ELS (M)	45	80,0	170	78,5	--

Cl_{CR}= clearance da creatinina

Na terceira semana, os pacientes receberam 200 mg de tartarato de metoprolol (Fase 3) e no sétimo dia foram internados na enfermaria da Divisão de Nefrologia do HC-FMRP-USP para as colheitas seriadas de sangue e urina e instalação da MAPA. Os pacientes, em estado de jejum de 12 horas, receberam pela manhã a dose diária de metoprolol com 200 mL de água. O almoço foi servido aproximadamente 4 horas após a administração do medicamento. As amostras de sangue foram obtidas em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos zero; 30 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 30 e 36 horas. Os plasmas foram separados por centrifugação (1800 g/ 10 min) e armazenados a -20°C até a análise. A urina foi obtida em vários intervalos até 36 horas após a administração. O volume total de urina coletado em cada período foi medido e uma alíquota de aproximadamente 20 mL foi armazenada a -20°C até a análise. Após esta etapa, os pacientes entraram na fase do placebo (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Osvaldo de Freitas da FCFRP-USP), tomando 1 comprimido pela manhã durante 7 dias, sendo que no sétimo dia foi realizada a MAPA (Fase 4). Os pacientes foram escolhidos de forma aleatória quanto à sequência de tratamento, alguns na sequência Fases 1, 2, 3 e 4 e outros na sequência Fases 4, 1, 2 e 3 (Figura 2).

Ao final de cada fase, incluindo a Basal, foram colhidas amostras de sangue para dosagem de noradrenalina. Foi inserido um cateter na veia antecubital dos pacientes 30 min antes da colheita. Durante este tempo, os pacientes permaneceram na posição supina e relaxados. O sangue (5mL) foi transferido para um tubo no gelo contendo 50 µL de uma solução de EGTA e glutathione (4,75 g de EGTA e 3,0 g de glutathione dissolvidos em 50 mL de água com o pH ajustado para 6-7). As amostras foram centrifugadas a 2400g por 5 min a 4 °C e os plasmas separados e armazenados a -70 °C até a análise^{18,26}.

FENOTIPAGEM- TESTE DA DEBRISOQUINA

FARMACOCINÉTICA- PROTOCOLO DO METOPROLOL

Figura 2 – Fluxograma referente ao protocolo clínico dos pacientes investigados

2 Análise estereosseletiva do metoprolol e seus metabólitos^{8,11,12,36}

2.1 Soluções-padrão e Reagentes

As soluções estoque de metoprolol (tartarato de metoprolol 97%, Sigma, St. Louis, EUA) e α -hidroximetoprolol racêmicos (*p*-hidroxi-benzoato, Astra Hässle, Mölndal, Suíça) foram preparadas na concentração de 0,2 mg da base livre/mL de metanol. A partir destas soluções foram realizadas diluições para obtenção das soluções de uso, nas concentrações 0,8; 1,0; 1,6; 2,0; 4,0; 8,0; 10; 20; 40; 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de metanol. Uma solução de 20 mg de α -hidroximetoprolol racêmico (base livre) em 1 mL de etanol foi preparada para separação e determinação da configuração absoluta dos quatro isômeros.

A solução estoque do ácido O-desmetilmetoprolóico racêmico (cloridrato, Astra Hässle, Mölndal, Suíça) foi preparada na concentração de 0,44 mg de base livre/ mL de metanol. A partir desta solução foram feitas diluições para obtenção das soluções de uso nas concentrações 0,528; 0,66; 1,32; 2,64; 5,28; 13,2; 26,4; 52,8; 132,0 e 264,0 $\mu\text{g/mL}$ de metanol.

O padrão de α -hidroximetoprolol com estereoquímica definida 1'S:1'R (70:30) foi gentilmente cedido pelo Prof. Wendel L. Nelson da Universidade de Washington (Seattle, EUA).

O cloreto de sódio e a solução de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹ foram lavados duas vezes com o solvente de extração éter diisopropílico: diclorometano (1:1, v/v).

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

2.2 Análise Cromatográfica

Para a análise do metoprolol, α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregado um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) constituído por bomba LC-10 AD, auto-injetor SIL-10ADVP com controlador de temperatura regulado a 5°C e um detector por fluorescência RF 551, operando em 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão). Para determinação da configuração absoluta dos enantiômeros do metabólito ácido foi empregado um detector por DC/UV, modelo 1595 (Jasco, Japão), operando a 274 nm. Para a determinação da configuração absoluta dos isômeros do α -hidroximetoprolol foi empregado um espectrômetro de DC, modelo CD6 (Jobin Yvon, Stanmore, Inglaterra) operando com uma cela de 0,5 mm de caminho ótico.

A separação dos enantiômeros do metoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol foi obtida a 25°C em coluna Chiralpak® AD (Daicel Chemical Industries, Nova York, EUA), com partículas de 10 μ m (250 x 4,6 mm) protegida por uma pré-coluna CN (Lichrospher® 100, 4x4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) empregando a fase móvel hexano:etanol:isopropanol:dietilamina (88:10,2:1,8:0,2, v/v) para análise em plasma e a fase móvel hexano:etanol:dietilamina (88:12:0,2, v/v) para análise em urina, ambas com fluxo de 1,2 mL/min. Para a separação dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregada uma coluna Chiralcel® OD-R (Daicel Chemical Industries, Nova York, EUA), com partículas de 10 μ m (250 x 4,6 mm) protegida por uma pré-coluna RP-18 (Nova-Pak®, Waters, Milford, MA, EUA), a 25°C, empregando a fase móvel tampão perclorato 0,5 mol.L⁻¹ pH=3,1:acetonitrila (85:15) com fluxo de 0,4 mL/min a 25°C.

2.3 Preparo das amostras

2.3.1 Metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma

A extração do metoprolol e do α -hidroximetoprolol do plasma foi realizada através de colunas de extração em fase sólida (Supelclean® LC-18, tubos de 3 mL, Supelco, Bellfonte, PA, EUA), empregando uma cuba extratora Visiprep® DL (Supelco, Bellfonte, PA, EUA) acoplada a uma bomba a vácuo Marconi (Mod. MA 058). As colunas foram condicionadas com 2 mL de metanol, seguidos por 2 mL de uma solução saturada de tetraborato dissódico. Sem permitir que as colunas secassem, foi adicionado 1 mL de plasma, previamente misturado com 0,5 mL de uma solução saturada de tetraborato dissódico, e as colunas foram lavadas com 2 mL de tetraborato dissódico 0,02 mol.L⁻¹ e 2 mL de água. Para retirada da água, a cuba foi submetida a vácuo por 20 min. Ainda com o objetivo de eliminar a água das colunas, 1 mL de acetonitrila foi adicionado e o sistema submetido a vácuo por mais 4 min. A eluição do metoprolol e do α -hidroximetoprolol foi realizada empregando 6 mL de metanol. As amostras foram concentradas sob corrente de ar comprimido até a secura. O resíduo obtido foi retomado em 100 μ L da fase móvel e 50 μ L foram submetidos à análise cromatográfica.

2.3.2 Metoprolol e α -hidroximetoprolol em urina

Alíquotas de 100 μ L de urina foram alcalinizadas com 25 μ L da solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹, adicionadas de 10 mg de cloreto de sódio, e extraídas com 2 mL da solução diclorometano:éter diisopropílico (1:1, v/v) durante 30 min em agitador horizontal (220 $\pm$ 10 ciclos/min). As amostras foram centrifugadas a 1800 g durante 5 min e as fases orgânicas (1,6 mL)

concentradas sob fluxo de ar. Os resíduos foram retomados em 200 μL de fase móvel e 50 μL foram submetidos à análise cromatográfica.

2.3.3 Ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma

Alíquotas de 400 μL de plasma foram alcalinizadas com 25 μL de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} e desproteinizadas com 3 mL de acetonitrila. Os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos. Após centrifugação, 3 mL do sobrenadante foram transferidos para outros tubos contendo o mesmo volume da mistura diclorometano:éter diisopropílico (1:1, v/v). Os tubos foram agitados por mais 1 minuto em vortex e centrifugados a 2500 g por 5 min. As fases aquosas (100 μL) foram transferidas para os frascos do injetor automático, adicionadas de 15 μL de ácido perclórico 0,225 mol.L^{-1} e submetidas a análise cromatográfica (50 μL).

2.3.4 Ácido O-desmetilmetoprolóico em urina

Alíquotas de 25 μL de urina foram diluídas e alcalinizadas com 200 μL de uma solução de tetraborato dissódico 0,2 mol.L^{-1} pH=9,0. Os tubos foram agitados em vortex por 30s antes da adição de 3 mL do solvente de extração (diclorometano:éter diisopropílico, 1:1, v/v). Os tubos foram agitados por mais 1 minuto em vortex e centrifugados a 1800 g por 5 min. As fases aquosas (100 μL) foram transferidas para outros tubos, adicionadas de 7,5 μL de ácido perclórico 0,4 mol.L^{-1} e submetidas a análise cromatográfica (20 μL).

2.4 Determinação da ordem de eluição dos isômeros

2.4.1 Configuração absoluta do α -hidroximetoprolol

A solução de α -hidroximetoprolol (20 mg/mL) foi injetada sucessivamente no sistema cromatográfico desenvolvido para análise deste metabólito na urina, usando um amostrador de 20 μ L. Os isômeros foram coletados separadamente e a fase móvel evaporada sob fluxo de ar a temperatura ambiente, resultando em 4,4 mg do primeiro pico (t_R = 16,5 min), 5,4 mg do segundo pico (t_R = 17,9 min), 5,3 mg do terceiro pico (t_R = 22,2 min) e 5,5 mg do quarto pico (t_R = 27 min). Os isômeros isolados foram dissolvidos em 1 mL de metanol e 200 μ L foram transferidos para a cela do espectrômetro de DC de 0,5 mm de caminho ótico. As medidas foram realizadas entre 240 e 320 nm a cada 0,25 nm e com 1 segundo para integração. O procedimento de leitura foi repetido três vezes e o espectro médio foi subtraído do espectro branco (metanol). O mesmo procedimento foi aplicado à solução preparada com o padrão de α -hidroximetoprolol com estereoquímica definida (1'S:1'R, 70:30).

2.4.2 Configuração absoluta do ácido O-desmetilmetoprolóico

Uma amostra de urina coletada de um dos pacientes incluídos no estudo (3-5 h após a administração de 200 mg de tartarato de metoprolol racêmico) contendo alta concentração do ácido O-desmetilmetoprolóico (~60 μ g/mL) foi submetida ao processo de derivatização descrito por Cerqueira et al. (2003)¹¹. Este método foi selecionado para este estudo por eluir os picos em menor tempo e com melhor resolução dos enantiômeros quando comparado ao

método descrito no item 2.2, possibilitando uma melhor visualização do sinal emitido pelo detector de DC. Em resumo, 25 μL de urina foram alcalizados com 200 μL de solução de tetraborato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e aplicados em colunas de extração em fase sólida Supelclean[®] LC-18, empregando metanol como eluente. Após a evaporação do metanol, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de ácido clorídrico 0,5 N preparado em metanol anidro e 200 mg de sulfato de sódio anidro adicionados. A reação de derivatização foi realizada com aquecimento da mistura a 60°C por 30 min. Após adição de 4 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH=7,0, os derivados foram extraídos com 7 mL de clorofórmio durante 3 min em agitador tipo vortex. O solvente orgânico foi transferido para outro tubo e, após secagem, o resíduo foi retomado na fase móvel (25 μL) e injetado no sistema cromatográfico (20 μL) empregando o detector de DC/UV, operando a 274 nm.

2.5 Curvas de calibração

As curvas de calibração para a análise dos enantiômeros do metoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina foram construídas com dados obtidos após análise de alíquotas de 1,0 mL de plasma branco enriquecidas com 25 μL de cada solução de uso ou alíquotas de 100 μL de urina branco enriquecidas com 50 μL de cada solução de uso (fluidos biológicos obtidos de voluntários sadios não medicados 72 h antes da coleta). Assim, as concentrações plasmáticas correspondem a 10; 20; 25; 50; 100 e 250 ng de cada enantiômero do metoprolol/mL e 5; 10; 12,5; 25; 50 e 125 ng de cada isômero do α -hidroximetoprolol/mL e as concentrações urinárias correspondem a 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 20 e 50 μg de cada enantiômero do metoprolol/mL e 0,125; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10 e 25 μg de cada isômero do α -hidroximetoprolol/mL. Para as curvas de calibração dos enantiômeros do

ácido O-desmetilmetoprolóico 50 μL das soluções de uso foram adicionadas a 25 μL de urina branco e 25 μL das soluções de uso foram adicionadas a 400 μL de plasma branco. As concentrações urinárias correspondem portanto a 0,66; 2,64; 5,28; 26,4; 52,8; 132,0 e 264,0 μg de cada enantiômero/mL e as concentrações plasmáticas correspondem a 16,5; 41,25; 82,5; 165; 330; 825 e 1650 ng de cada enantiômero/mL.

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

2.6 Validação

2.6.1 Recuperação

Para avaliar a eficiência dos procedimentos de extração, amostras de plasma ou urina branco enriquecidas com soluções padrão de α -hidroximetoprolol (5; 10; 25 e 50 ng de cada isômero/mL de plasma e 0,25; 1,25; 12,5 e 25 μg de cada isômero/mL de urina) foram submetidas aos procedimentos de extração descritos nos itens 2.3.1 e 2.3.2.

Para avaliar se houve perda do ácido O-desmetilmetoprolóico durante o processo de purificação, amostras de urina branco foram enriquecidas com soluções padrão do ácido O-desmetilmetoprolóico (4,4 e 88 μg de cada enantiômero/mL de urina) e submetidas ao procedimento de purificação descrito no item 2.3.4.

As concentrações dessas amostras foram calculadas com base em curvas de calibração construídas com dados obtidos de soluções padrão não submetidas aos procedimentos de extração.

2.6.2 Limite de quantificação e linearidade

A linearidade dos métodos analíticos foi estudada com amostras de plasma ou urina branco enriquecidas com concentrações crescentes do fármaco e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica. Os métodos foram considerados lineares até a maior concentração plasmática ou urinária que apresentou relação linear com a resposta do detector. Foram calculadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação¹.

O limite de quantificação é o parâmetro que expressa a sensibilidade dos métodos. Assim, foram analisadas amostras de α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina em concentrações decrescentes àquelas empregadas na construção das curvas de calibração. O limite de quantificação foi definido como a menor concentração analisada com precisão de 20% e inexatidão de 20%¹.

2.6.3 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. As soluções de α -hidroximetoprolol foram preparadas nas concentrações de 20 ng/mL de plasma, 1 e 12,5 μ g/mL de urina. As soluções do ácido O-desmetilmetoprolóico foram preparadas nas concentrações de 4,4 e 44 μ g/mL de urina e 52,8 e 528 ng/mL de plasma. Essas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-ensaio foram analisadas 8 alíquotas dessas soluções em um mesmo dia, ou seja, através de uma única curva de calibração, construída para cada fármaco.

Na avaliação da precisão e da exatidão interensaios foram analisadas alíquotas, em duplicatas, das soluções de α -hidroximetoprolol e do ácido O-desmetilmetoprolóico durante 5 dias consecutivos.

A avaliação da precisão intra e interensaios foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido de alta precisão, o coeficiente de variação deve ser igual ou inferior a 15%. O desvio entre a concentração experimental e a concentração teórica não deve exceder 15% para que o método possa ser considerado de alta exatidão¹.

2.6.4 Estabilidade e racemização

A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos depende de suas propriedades físico-químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. O estudo de estabilidade foi realizado empregando um conjunto de amostras preparadas a partir de uma solução estoque do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferentes. Testes de estabilidade de curta e longa duração foram aplicados para avaliar a estabilidade dos metabólitos do metoprolol em plasma e urina. Para o teste de estabilidade de curta duração foram realizados três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando duas amostras das concentrações alta e baixa. As amostras foram congeladas a -20°C e mantidas por 24 h, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente (25°C). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a mesma temperatura e assim sucessivamente até completar 3 ciclos. As amostras foram quantificadas após o término do terceiro ciclo. Para o teste de estabilidade de longa duração três amostras de concentrações alta e baixa foram preparadas e uma alíquota analisada no mesmo dia. O restante das amostras foi armazenado a -20°C e analisado após 45 dias. Os resultados foram comparados àqueles obtidos no primeiro dia¹.

A racemização do α -hidroximetoprolol foi avaliada após o enriquecimento de plasma e urina brancos com os isômeros isolados e comparação da pureza isomérica das amostras antes e após o procedimento de extração¹.

2.6.5 Seletividade

O estudo da seletividade dos métodos visa verificar se os componentes endógenos da matriz biológica, metabólitos do metoprolol ou a administração concomitante de outros medicamentos ao paciente investigado resulta em interferência na determinação quantitativa dos fármacos de interesse.

Foram avaliados diferentes fármacos passíveis de administração concomitante com o metoprolol. As concentrações estudadas foram baseadas em dados da literatura referentes às concentrações plasmáticas do medicamento observadas em situações de doses terapêuticas. As soluções padrão dos fármacos foram preparadas em metanol e submetidas às análises cromatográficas.

2.6.6 Robustez

A robustez do método cromatográfico indica a suscetibilidade a variações nas condições analíticas, devendo estas serem adequadamente controladas ou precauções incluídas no procedimento. As variações consideradas no caso de cromatografia líquida de alta eficiência são a influência das variações de pH, fluxo e composição da fase móvel, diferentes colunas (diferentes lotes ou fabricantes) e temperatura.

3 Análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina em urina

A análise da debrisoquina e 4-hidroxidebrisoquina racêmica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o método descrito por Cerqueira et al. (2000)¹⁰. Em resumo, a separação cromatográfica

foi obtida em coluna RP-Select-B Lichrospher® 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha), com partículas de 5 µm (250 x 4 mm) protegida por pré coluna RP-8 (Lichrospher® 100, 4x4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída por tampão acetato 0,25 N, pH = 5,0:acetonitrila (9:1, v/v). Para o preparo das amostras, alíquotas de 1,0 mL de urina foram alcalinizadas e adicionadas de 200 mg de cloreto de sódio e 6 mL da mistura diclorometano:isopropanol (6:4, v/v). A extração da debrisoquina e de seu metabólito foi viabilizada mediante agitação mecânica por 3 min, seguida de centrifugação a 2000 g por 5 min. As fases orgânicas (5,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e concentradas sob fluxo de ar comprimido até a secura. Os resíduos obtidos foram retomados em 100 µL de fase móvel, dos quais 20 µL foram cromatografados.

4 Análise de noradrenalina em plasma

A análise de noradrenalina plasmática foi desenvolvida com base no método descrito por Foster & Macdonald (1999)¹⁸. As soluções estoque de noradrenalina, adrenalina, dopamina, dl-normetanefrina; dl-metanefrina e 3-metoxitiramina (Sigma, St. Louis, EUA) foram preparadas em ácido acético 400 mmol.L⁻¹ na concentração de 1 mmol.L⁻¹. A solução de noradrenalina foi diluída para obtenção das soluções de uso nas concentrações de 20; 40; 80; 120; 160 e 200 nmol.L⁻¹ em ácido acético 400 mmol.L⁻¹.

Os reagentes glutathione, EGTA, DPBEA e ToABR foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA).

Para a análise da noradrenalina em plasma foi empregado um cromatógrafo Shimadzu constituído por bomba modelo LC-10 AD, injetor Rheodyne com amostrador de 20 µL e um detector eletroquímico com eletrodo Ag/AgCl modelo L-ECD-6A Shimadzu, operando com potencial de + 0,80 V. A separação das catecolaminas foi obtida em coluna Nova-Pak® C-18

(Waters, Milford, MA, EUA), com partículas de 4 μm (150 x 3,9 mm) empregando a fase móvel (0,2 mL/min) constituída de 9,02 g de acetato de sódio, 0,372 g de EDTA, 100 mg de SDS e 200 mL de metanol/L de água, sendo o pH ajustado previamente para 5,10 com ácido acético glacial.

As amostras foram preparadas com 500 μL de plasma adicionados de 500 μL de tampão amônio 2 mol.L pH= 8,8 contendo 4 g/L de DPBEA e 1,5 mL de heptano contendo 3,5 g/L de ToABR e 10 mL/L de octanol. A mistura foi agitada em vortex por 90 s e centrifugada a 1200 g por 5 min. A fase orgânica (1000 μL) foi transferida para outro tubo e adicionada de 500 μL de octanol e 55 μL de ácido acético 400 mmol.L⁻¹. A mistura foi novamente agitada por mais 90 segundos e centrifugada a 1200 g por 1 minuto. A fase aquosa inferior (50 μL) foi submetida a análise cromatográfica. As amostras foram mantidas no gelo e protegidas da luz até a análise. A curva de calibração da noradrenalina foi construída com 1,0 mL de tampão amônio enriquecido com 25 μL das soluções padrão, correspondendo portanto a 1; 2; 4; 6; 8 e 10 pmol/mL de plasma.

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

5 Análise farmacocinética

5.1 Concentração plasmática

A disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol, no estado de equilíbrio, foi analisada com base no modelo bicompartimental aberto. A disposição cinética estereosseletiva dos metabólitos α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico foi analisada com base no modelo monocompartimental aberto. A meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi

determinada diretamente pelo método gráfico ($\log c$ versus t). As constantes de velocidade de absorção (K_a) e eliminação (β) foram calculadas através da equação $0,693/t^{1/2}$. A concentração plasmática máxima ($C_{\max}$) e o tempo para atingir $C_{\max}$ ($t_{\max}$) foram obtidos diretamente das curvas concentrações plasmáticas enantioméricas obtidas. A área sob a curva concentração plasmática versus tempo (AUC_{0-24}^{SS}) foi calculada através do método dos trapezóides. Esse parâmetro foi empregado nos cálculos do *clearance* total aparente ($Cl_T/f = \text{dose} / AUC_{0-24}^{SS}$) e do volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$) para os enantiômeros do metoprolol⁶⁴.

Para construção das curvas das razões enantioméricas do metoprolol, a concentração plasmática do (S)-(-)-metoprolol foi dividida pela concentração plasmática do enantiômero (R)-(+)- em cada tempo de coleta. Para construção das curvas de razões metabólicas, as concentrações plasmáticas dos isômeros do α -hidroximetoprolol e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foram divididas pela concentração plasmática do correspondente enantiômero do metoprolol inalterado em cada tempo de coleta.

Os valores individuais de concentrações plasmáticas do (S)-(-)-metoprolol encontrados nas Fases 1 e 2 (vale/pico) e Fase 3 (0-24 h) foram empregados na caracterização da farmacocinética populacional do metoprolol administrado nas doses de 50 mg (Fase 1) e 100 mg (Fase 2). Esta análise foi realizada com o auxílio do programa NONMEM (EUA), versão V, com software de interface Visual NONMEM5. A disposição cinética do (S)-(-)-metoprolol foi caracterizada por cinética de primeira ordem, modelo bicompartimental descrito pelo *clearance*, volume do compartimento de distribuição central, volume de distribuição periférico, *lag-time* e constante de velocidade de absorção. Esse modelo usou as vias ADVAN4 e TRANS4 do NONMEM para determinar as curvas de concentrações plasmáticas versus tempo das Fases 1 e 2.

5.2 Excreção Urinária

A quantidade de metoprolol inalterado e dos metabólitos (A_e) em cada intervalo de coleta de urina, foi obtida multiplicando-se a concentração urinária (C_u) pelo volume de urina no intervalo de coleta (V_u). A quantidade total excretada na urina após 24 h (A_e^{0-24}) foi calculada pela somatória dos valores referentes a cada intervalo.

O *clearance* renal (Cl_R) dos isômeros do metoprolol, do ácido O-desmetilmetoprolóico e do α -hidroximetoprolol foi calculado pela equação $A_e^{0-24}/AUC^{SS}_{0-24}$.

A fração da dose de metoprolol e seus metabólitos excretada na urina (F_e/f) foi calculada através da equação $F_e/f = A_e^{0-24}/Dose$, sendo a dose dos metabólitos corrigida pelo peso molecular. O *clearance* de formação (Cl_M) dos metabólitos foi calculado multiplicando-se a fração da dose do metabólito excretada (F_e/f) pelo *clearance* total (Cl_T/f) do correspondente enantiômero do metoprolol inalterado.

A constante de velocidade de eliminação total (K_{el}) de cada isômero foi calculada através da excreção renal do isômero, usando a curva log da velocidade de excreção urinária ($\Delta A_e/\Delta t$) *versus* tempo médio do período de coleta (t_{mid}). A partir dessa curva, foi determinada a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$). A constante de velocidade de eliminação foi calculada através da equação $K_{el} = 0,693/t_{1/2}^{64}$.

5.3 Fenótipo oxidativo tipo debrisoquina

A quantidade (A_e) de debrisoquina inalterada e de 4-hidroxidebrisoquina excretadas no intervalo de coleta de urina (0-8 h) foi obtida multiplicando-se a concentração urinária (C_u) pelo volume de urina no intervalo de coleta (V_u). A razão metabólica foi calculada dividindo-se a quantidade de debrisoquina inalterada pela quantidade de 4-

hidroxidebrisoquina excretadas no intervalo de tempo de 0-8 h ($DMR = Ae \text{ debrisoquina} / Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina}$). A razão de recuperação foi calculada dividindo-se a quantidade de 4-hidroxidebrisoquina pela somatória da quantidade de debrisoquina inalterada e 4-hidroxidebrisoquina no intervalo de tempo de 0-8 h ($DRR = Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina} / (Ae \text{ debrisoquina} + Ae \text{ 4-hidroxidebrisoquina})$).

Para avaliação da correlação entre o fenótipo tipo debrisoquina e o metabolismo do metoprolol foi aplicado o teste de Spearman ($\alpha=0,05$) entre a razão metabólica debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina e a razão de concentração plasmática metoprolol/ α -hidroximetoprolol 3 h após a administração de metoprolol⁶⁶.

6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Instat[®] para obtenção da média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para a avaliação das razões enantioméricas diferentes da unidade (S)-(-)/(R)-(+)-metoprolol e (S)-(-)/(R)-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregado o teste Wilcoxon bicaudado para dados pareados. Para a avaliação das razões isoméricas do α -hidroximetoprolol foi empregada ANOVA para medidas repetidas com pós-teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Para a avaliação dos parâmetros farmacodinâmicos (pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, frequência cardíaca e concentração de noradrenalina) nas cinco fases do protocolo clínico foi empregada ANOVA para medidas repetidas, não paramétrico com pós-teste Friedman. Para comparar dados dos grupos Controle e IRC foi empregado o teste Mann-Whitney bicaudado para dados não pareados. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

IV RESULTADOS

1 Análise cromatográfica

A análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol foi realizada em plasma após extração em fase sólida e em urina após extração líquido-líquido. A separação dos isômeros foi obtida utilizando a coluna Chiralpak® AD protegida por uma pré-coluna Lichospher® 100 CN com fase móvel hexano: etanol: isopropanol: dietilamina (88: 10,2: 1,8: 0,2; v/v/v/v) para análise em plasma e hexano: etanol: dietilamina (88: 12: 0,2; v/v/v) para análise em urina sob o fluxo de 1,2 mL/min. Os cromatogramas apresentados na Figura 3 mostram que os componentes endógenos do plasma e da urina não interferem nos métodos analíticos.

Os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foram eficientemente separados na coluna Chiralcel® OD-R com fase móvel constituída por tampão perclorato 0,5 mol.L⁻¹ pH=3,1: acetonitrila (85:15, v/v) após purificação do plasma e da urina com solvente orgânico, como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na Figura 4.

A noradrenalina foi analisada em plasma após extração líquido-líquido, em coluna Nova-Pak® C-18 e fase móvel constituída de 9,02 g de acetato de sódio, 0,372 g de EDTA, 100 mg de SDS e 200 mL de metanol em 1 L de água sendo o pH previamente ajustado para 5,10 com ácido acético glacial. Os cromatogramas apresentados na Figura 5 mostram que os componentes endógenos do plasma não interferem no método analítico.

Figura 3 - Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma (I) e urina (II). (A) Branco; (B) Plasma ou urina enriquecidos com padrão de metoprolol e α -hidroximetoprolol; (C) Amostras do paciente LSS

- 1 - (R)-(+)-metoprolol
- 2 - (S)-(-)-metoprolol
- 3 - 1'S,2R- α -hidroximetoprolol
- 4 - 1'S,2S- α -hidroximetoprolol
- 5 - 1'R,2R- α -hidroximetoprolol
- 6 - 1'R,2S- α -hidroximetoprolol

Figura 4 - Cromatogramas referentes a análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma (I) e urina (II). (A) Branco; (B) Plasma ou urina enriquecidos com padrão do ácido O-desmetilmetoprolólico; (C) Amostras de paciente

Figura 5 - Cromatogramas referentes a análise das catecolaminas em plasma. (A) Branco de plasma; (B) Plasma enriquecido com padrão. 1 – noradrenalina; 2 – adrenalina; 3 – dopamina; 4 – dl-normetanefrina; 5 – dl-metanefrina

2 Determinação da ordem de eluição dos isômeros

A análise dos espectros de dicroísmo circular dos isômeros puros do α -hidroximetoprolol permitiram determinar a configuração absoluta destas substâncias, como pode ser observado na Figura 6. Os dois primeiros isômeros eluídos mostraram um efeito Cotton positivo na região de 280 nm enquanto os dois últimos apresentaram um efeito Cotton negativo nessa mesma região. Portanto, a ordem de eluição dos isômeros do α -hidroximetoprolol no sistema cromatográfico desenvolvido é 1'S,2R; 1'S,2S; 1'R,2R e 1'R,2S.

A ordem de eluição dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foi determinada empregando-se um detector de DC para identificar os dois enantiômeros resolvidos sem e após o processo de derivatização descrito por

Cerqueira et al. (2003)¹⁰. Podemos observar na Figura 7 que o primeiro enantiômero eluído da coluna Chiralcel[®] OD-H com a fase móvel hexano:etanol: DEA (90:10:0,2,v/v/v) apresenta um sinal positivo e o segundo enantiômero apresenta um sinal negativo no cromatograma de DC em 274 nm. Os espectros dos enantiômeros puros do metoprolol apresentam um sinal positivo a 274 nm para o (R)-(+)-metoprolol e um sinal negativo no mesmo comprimento de onda para o (S)- (-)-metoprolol. Com base na pequena diferença entre a estrutura química deste metabólito e a do metoprolol, sem nenhuma alteração no centro quiral, nós podemos assumir a mesma configuração absoluta para os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico, determinando a ordem de eluição como (R)-(+)- e (S)- (-)-ácido O-desmetilmetoprolóico.

Figura 6- Espectros de DC dos isômeros puros do α -hidroximetoprolol

Figura 7- Cromatogramas referentes a análise de dicroísmo circular (DC) dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico. (R)-(+)- (5,23 min.; pico positivo no DC) e (S)- (-)-ácido O-desmetilmetoprolóico (6,78 min.; pico negativo no DC)

3 Validação

Os métodos desenvolvidos para análise dos isômeros dos metabólitos do metoprolol foram validados quanto a recuperação, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão inter e intra-ensaios, estabilidade, racemização, robustez e seletividade. Os resultados da validação dos métodos de análise dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina estão descritos em Cerqueira (1999)⁸.

3.1 Análise estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina

As TABELAS 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os resultados obtidos na validação dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Pode ser observada uma melhor recuperação no procedimento de extração em fase sólida, quando comparado a extração líquido-líquido. Os altos coeficientes de correlação (r) obtidos indicam a existência de relação linear entre as áreas e as concentrações dos isômeros. Os dois métodos apresentaram limite de quantificação, seletividade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudo de metabolismo estereosseletivo do metoprolol em pacientes hipertensos submetidos a terapia crônica com este fármaco. O teste de racemização mostrou não haver interconversão dos isômeros durante os processos de extração do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. A separação dos quatro isômeros do α -hidroximetoprolol exige condições de análise com controle rigoroso de temperatura da coluna cromatográfica e de preparo da fase móvel, principalmente para análise em plasma. A troca da coluna por outra igual, mesmo que do mesmo lote de fabricação não é recomendado pois o uso de dietilamina na fase móvel promove o desenvolvimento de uma “memória” na coluna Chiralpak® AD.

TABELA 2 – Limites de confiança para o método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina

α -Hidroximetoprolol	Recuperação	Limite de quantificação	Linearidade
Plasma	(%)	ng/mL (CV%, n=5)	ng/mL (r)
1'S,2R	93,2	2,0 (6,3)	2,0 – 200 (0,9981)
1'S,2S	92,0	2,0 (11,7)	2,0 – 200 (0,9989)
1'R,2R	101,0	2,0 (6,8)	2,0 – 200 (0,9990)
1'R,2S	88,5	2,0 (11,6)	2,0 – 200 (0,9992)
Urina			$\mu\text{g/mL}$ (r)
1'S,2R	66,3	125 (12,0)	0,125 – 25,0 (0,9975)
1'S,2S	64,8	125 (12,8)	0,125 – 25,0 (0,9992)
1'R,2R	62,3	125 (13,7)	0,125 – 25,0 (0,9986)
1'R,2S	60,9	125 (10,6)	0,125 – 25,0 (0,9987)

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

r = coeficiente de correlação linear.

TABELA 3 - Estudo da precisão dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol. Precisão intra-ensaio (n=10)

Concentração adicionada	Precisão (CV %)	Exatidão (% Inexatidão)
Plasma		
20 ng/mL		
1'S,2R	1,6	+4,6
1'S,2S	3,5	+4,8
1'R,2R	1,1	+4,4
1'R,2S	3,3	+2,5
Urina		
1 μg/mL		
1'S,2R	9,1	+5,0
1'S,2S	9,9	+6,0
1'R,2R	9,4	+7,0
1'R,2S	9,9	+5,0
12,5 μg/mL		
1'S,2R	9,6	+1,8
1'S,2S	9,4	-3,1
1'R,2R	10,2	+2,9
1'R,2S	10,7	+1,7

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

% Inexatidão = [(Concentração_{observada} - Concentração_{adicionada}) / Concentração_{adicionada}] x 100.

TABELA 4 - Estudo da precisão dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol. Precisão interensaios (n=5)

Concentração adicionada	Precisão (CV %)	Exatidão (% Inexatidão)
Plasma		
20 ng/mL		
1'S,2R	1,6	+1,0
1'S,2S	3,5	+2,0
1'R,2R	1,1	+1,3
1'R,2S	3,3	+2,9
Urina		
1 µg/mL		
1'S,2R	5,9	+7,0
1'S,2S	4,3	+7,0
1'R,2R	3,9	+9,0
1'R,2S	5,8	+1,0
12,5 µg/mL		
1'S,2R	13,5	-0,8
1'S,2S	11,8	-2,4
1'R,2R	14,9	-0,8
1'R,2S	14,2	+0,8

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

% Inexatidão = [(Concentração_{observada} - Concentração_{adicionada}) / Concentração_{adicionada}] x 100.

TABELA 5 – Estudo de estabilidade de longa duração (45 dias) dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma

Concentração da amostra (ng/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (% Inexatidão)
18,54 ng/mL (n=3)		
1'S,2R	4,6	-5,4
1'S,2S	3,6	-4,8
1'R,2R	3,1	-5,1
1'R,2S	4,5	-7,8

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

% Inexatidão = [(Concentração_{observada} - Concentração_{adicionada}) / Concentração_{adicionada}] x 100.

TABELA 6 – Estudo da seletividade dos métodos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina

Fármaco	Concentração (μ g/mL)	Tempo de Retenção (min)	
		Plasma	Urina
α -hidroximetoprolol – 1'S,2R	0,1	15,8	16,5
α -hidroximetoprolol – 1'S,2S	0,1	16,6	17,9
α -hidroximetoprolol – 1'R,2R	0,1	20,1	22,2
α -hidroximetoprolol – 1'R,2S	0,1	24,3	27
(S)-(-)-metoprolol	0,05	7,8	7,8
(R)-(+)-metoprolol	0,05	6,0	6,3
N-desalquimetoprolol	0,1	ND	ND
O-desmetilmetoprolol	0,1	10,4/12,2	10,5/12,5
Ácido O-desmetilmetoprolóico	0,1	32	25,3*
Atenolol	0,4	19,9	19,6/20,3
Benzidamina	0,8	4,2	4,1
Lidocaína	5,0	4,0	3,9
Pindolol	0,2	8,5/10,4	8,5/10,3
Sotalol	6,0	12,6/20,3	12,2/21,5
Verapamil	0,4	5,8/6,3	5,6/6,0

ND: Não detectado (0 a 45 min); * removido no processo de extração

Fármacos não detectados (0 a 45 min): acetaminofeno, aminopirina, amiodarona, carbamazepina, captopril, clobazam, clomipramina, clonazepam, clorpromazina, dapsona, digoxina, disopiramida, etidocaína, metoclopramida, nitrazepam, propafenona, quinidina, teofilina, trimipramina.

3.2 Análise enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma e urina

As TABELAS 7, 8, 9 e 10 mostram os resultados obtidos na validação dos métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma e urina. Pode ser observado que o processo de purificação elimina seletivamente o metoprolol e os outros metabólitos, sem perda do metabólito ácido. Os altos coeficientes de correlação (r) obtidos indicam a existência de relação linear entre as áreas e as concentrações dos enantiômeros. Os métodos apresentaram limites de quantificação, seletividade e precisão compatíveis com estudo de metabolismo enantiosseletivo do metoprolol em pacientes hipertensos submetidos a terapia crônica com este fármaco.

TABELA 7 – Limites de confiança para os métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma e urina

Ácido O-desmetilmetoprolólico	Perda	Limite de quantificação	Linearidade
Plasma (ng/mL)	(%, n=4)	(CV %, n=5)	(r)
(R)-(+)-AODM	--	16,5 (6,8)	16,5 – 3300 (0,995)
(S)-(-)- AODM	-	16,5 (12,3)	16,5 – 3300 (0,998)
Urina (µg/mL)			
(R)-(+)- AODM		0,5 (9,4)	0,5 – 220
4,4	-14,9		(0,993)
88	-9,8		
(S)-(-)- AODM		0,5 (5,5)	0,5 – 220
4,4	-9,9		(0,993)
88	-13,6		

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

r= coeficiente de correlação linear.

TABELA 8 - Estudo da precisão dos métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico. Precisão intra-ensaio (n=10) e interensaios (n=5)

Concentração	Precisão intra-ensaio (CV %)	Precisão interensaios (CV %)
Plasma		
52,8 ng/mL		
(R)-(+)- AODM	7,7	3,3
(S)-(-)- AODM	5,5	2,8
528 ng/mL		
(R)-(+)- AODM	9,1	13,0
(S)-(-)- AODM	12,3	14,1
Urina		
4,4 µg/mL		
(R)-(+)- AODM	7,6	13,9
(S)-(-)- AODM	11,1	11,8
44 µg/mL		
(R)-(+)- AODM	12,8	9,4
(S)-(-)- AODM	8,8	10,7

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100].

TABELA 9 – Estudo da seletividade do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma e urina

Fármaco	Concentração (µg/mL)	Tempo de retenção (min)
(R)-(+)-Ácido O-desmetilmetoprolólico	11	16,6
(S)-(-)-Ácido O-desmetilmetoprolólico	11	18,6
α-Hidroxi metoprolol	0,1	11,3/12,2*
Metoprolol	0,05	43,1/51,8*
N-Desalquilmetoprolol	0,1	21,6*
O-Desmetilmetoprolol	0,1	13,6/15,3*

ND: Não detectado (0 a 45 min); * Excluídos no processo de purificação.

Fármacos não detectados (0 a 45 min): acetaminofeno, carbamazepina, cimetidina, diazepam, hidroclorotiazida, imipramina, furosemida, ranitidina, diclofenaco, digoxina, quinidina.

TABELA 10 – Estudo de estabilidade dos métodos de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (n=3)

Concentração	Curta duração (3 dias)		Longa duração (45 dias)	
	Precisão (CV %)	Exatidão (% inexatidão)	Precisão (CV %)	Exatidão (% inexatidão)
Plasma				
2750 ng/mL				
(R)-(+)- AODM	2,6	-12,6	2,3	+5,9
(S)-(-)- AODM	3,4	-11,9	2,5	+5,8
Urina				
5,52 µg/mL				
(R)-(+)- AODM	7,6	+14,4	12,9	+4,3
(S)-(-)- AODM	2,8	+14,0	0,9	+9,2
110,4 µg/mL				
(R)-(+)- AODM	7,4	+0,8	11,5	+3,2
(S)-(-)- AODM	9,7	+1,1	8,5	+3,9

CV = coeficiente de variação [(estimativa do desvio padrão/ média) x 100];

% Inexatidão= [(Concentração_{observada}-Concentração_{adicionada})/Concentração_{adicionada}] $\times$ 100.

4 Estudo Clínico

4.1 Teste da debrisoquina

Os resultados da investigação do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina estão apresentados na TABELA 11. As razões metabólicas debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina inferiores a 12,6 e as razões de recuperação 4-hidroxidebrisoquina/debrisoquina+4-hidroxidebrisoquina superiores a 0,12 designam o fenótipo de metabolizador rápido (EM) da debrisoquina. Os pacientes WGB e ILS apresentaram valores diferentes dos limites, sendo designados com o fenótipo de metabolizador lento (PM) e excluídos dos grupos de estudo. A Figura 8 mostra a frequência de distribuição das razões metabólicas debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina (urina 0-8 h) nos pacientes investigados.

TABELA 11 – Investigação do fenótipo oxidativo tipo debrisoquina

Paciente	DEB/4-OHDEB	4-OHDEB/ 4-OHDEB+DEB	Fenótipo
LSS	0,41	0,71	EM
BMS	0,53	0,66	EM
MDSM	0,68	0,59	EM
ALR	0,19	0,84	EM
BAS	0,03	0,97	EM
JCG	0,50	0,67	EM
ILS	19,75	0,05	PM
JLC	0,55	0,51	EM
MJJC	0,22	0,82	EM
LAM	0,90	0,53	EM
CSB	0,57	0,64	EM
WGB	> 200	< 0,004	PM
MASD	0,62	0,62	EM
CAS	0,35	0,74	EM
ELS	0,24	0,80	EM

EM= metabolizador rápido; PM= metabolizador lento.

Figura 8 – Frequência de distribuição da razão urinária log debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina 0-8 h nos 15 pacientes investigados

4.2 Parâmetros farmacodinâmicos

4.2.1 Noradrenalina plasmática

A concentração plasmática de noradrenalina foi quantificada nas 5 fases do protocolo clínico para avaliar a sua relação com a administração de metoprolol. Os dados apresentados na TABELA 12 e na Figura 9 demonstram não haver relação entre a administração de metoprolol e as concentrações plasmáticas de noradrenalina. Não houve diferença na concentração plasmática de noradrenalina entre os grupos Controle e IRC.

TABELA 12- Concentrações plasmáticas de noradrenalina nas diferentes fases do protocolo clínico. Média (IC 95%)

Grupo	Concentração plasmática (pmol/mL)				
	Basal	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Placebo
Controle (n=7)	1,833 (1,29-2,37)	2,47 (1,52-3,41)	2,60 (1,69-3,50)	2,59 (1,46-3,72)	2,32 (1,65-2,98)
IRC (n=6)	3,28 (1,51-5,05)	2,70 (1,56-3,84)	2,65 (1,77-3,52)	2,07 (1,61-2,52)	4,05 (1,57-6,53)

* $p < 0,05$, Teste Friedman para medidas repetidas não paramétrico;

$p < 0,05$, Teste Mann-Whitney (Controle *versus* IRC).

Figura 9 – Concentrações plasmáticas de noradrenalina nas diferentes fases do tratamento. Média $\pm$ EPM

4.2.2 Parâmetros cardiovasculares.

Medidas de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca foram realizadas empregando a MAPA durante as cinco fases de tratamento nos pacientes incluídos no estudo. Os dados apresentados na TABELA 13 e Figuras 10 e 11 evidenciam diferenças com significância estatística ($p < 0,05$) na frequência cardíaca entre o tratamento com 200 mg de tartarato de metoprolol (Fase 3) e os tratamentos nos quais os pacientes não recebem o fármaco (Basal e Placebo). Não houve diferença entre os grupos Controle e IRC.

Figura 10 – Frequência cardíaca dos grupos Controle e IRC nas fases basal e após 200 mg de metoprolol (Fase 3) ou placebo. Média $\pm$ EPM

TABELA 13- Pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca no período da vigília nas fases basal e após tratamento com doses múltiplas de metoprolol ou placebo. Médias (IC 95%)

	PA sistólica (mmHg)	PA diastólica (mmHg)	Frequência cardíaca (bpm)
Grupo Controle			
Basal	143,7 (135,5-151,9)	91,3 (78,8-103,7)	84,3* (77,4-91,2)
Fase 1 (50 mg)	137,6 (121,3-153,8)	88,8 (75,0-102,7)	73,4 (66,4-80,4)
Fase 2 (100 mg)	137,8 (124,3-151,4)	86,3 (74,4-98,2)	70,1 (62,1-78,2)
Fase 3 (200 mg)	131,1 (116,3-146,0)	82,3 (70,6-94,0)	63,7 (54,6-72,7)
Placebo	139,3 (126,6-152,0)	94,0 (69,3-118,7)	84,7 [#] (77,0-92,4)
Grupo IRC			
Basal	151,1 (137,4-165,8)	100,4 (89,3-111,5)	81,4* (69,7-93,1)
Fase 1 (50 mg)	151,4 (128,5-174,3)	97,8 (82,9-112,6)	75,0 (64,5-85,0)
Fase 2 (100 mg)	156,8 (138,6-174,9)	102,8 (92,5-113,0)	72,8 (64,7-80,9)
Fase 3 (200 mg)	160,4 (134,7-186,1)	103,8 (89,1-118,5)	64,2 (56,3-72,1)
Placebo	162,0 (142,6-181,4)	101,2 (89,3-113,2)	84,3 [#] (59,4-109,2)

p<0,05, pós-teste Friedman. *Basal *versus* Fase 3; [#] Placebo *versus* Fase 3
p < 0,05, Teste Mann-Whitney (Controle *versus* IRC).

A

B

Figura 11 - Curvas de concentração plasmática do (S)-(-)-metoprolol e frequência cardíaca *versus* tempo para as fases do protocolo com doses crescentes de metoprolol. A- Controle, B-IRC. Média $\pm$ EPM

4.3 Metabolismo do metoprolol

Os métodos desenvolvidos foram empregados no estudo do metabolismo do metoprolol, realizado através da quantificação de seus enantiômeros assim como dos isômeros de seus metabólitos α -hidroximetoprolol (OHM) e ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em plasma e urina. As curvas médias de concentrações plasmáticas *versus* tempo e uma curva representativa de velocidade de excreção urinária *versus* tempo médio no intervalo de coleta de um paciente podem ser observadas nas Figuras 12 e 13, respectivamente. As curvas médias de razões metabólicas 2R-OHM/R-metoprolol e 2S-OHM/S-metoprolol *versus* tempo estão apresentadas na Figura 14-I e as curvas médias de razões metabólicas R-AODM/R-metoprolol e S-AODM/S-metoprolol *versus* tempo estão apresentadas na Figura 14-II. Os parâmetros farmacocinéticos que apresentaram diferenças com significância estatística entre os grupos Controle e IRC estão apresentados na Figura 15.

Os pacientes WGB e ILS, fenotipados como metabolizadores lentos da debrisoquina, foram incluídos no protocolo a fim de avaliar a enantiosseletividade em pacientes que não apresentam ou apresentam baixa atividade do CYP2D6. A ausência de formação do α -hidroximetoprolol foi observada nesses pacientes. Os gráficos comparativos das curvas destes pacientes com as curvas médias dos grupos pertencentes, para o metoprolol e o ácido O-desmetilmetoprolóico estão apresentados na Figura 16. As curvas individuais dos dois pacientes PM e as curvas médias dos dois grupos das razões (S)-(-)/(R)-(+)-metoprolol em função do tempo estão apresentadas na Figura 17. A correlação entre a razão metabólica urinária debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina e a razão plasmática (3h) metoprolol/ α -hidroximetoprolol está apresentada na Figura 18. Os parâmetros farmacocinéticos representados pelas mediana, média e intervalo de confiança de 95% estão apresentados nas TABELAS 14 a 23 e os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados no Apêndice 4.

GRUPO CONTROLE (n=7)**GRUPO IRC (n=6)****I** **II** **III**

Figura 12 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III). Dados expressos como média e EPM

GRUPO CONTROLE- MJJC

GRUPO IRC- BMS

I

II

III

Figura 13 - Curvas de excreção urinária dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e do ácido O-desmetilmetoprolóico (III). Dados representativos dos pacientes MJJC (controle) e BMS (IRC)

GRUPO CONTROLE (n=7)

GRUPO IRC (n=6)

I

II

Figura 14 - Curvas de razões de concentrações plasmáticas *versus* tempo. (I) isômeros do α -hidroximetoprolol/ enantiômeros do metoprolol; (II) enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico/ enantiômeros do metoprolol. Dados expressos como média $\pm$ EPM

Figura 15 – Parâmetros farmacocinéticos que diferem entre os grupos Controle (■) e IRC (■) ($p < 0,05$). Dados expressos através das médias $\pm$ EPM

GRUPO CONTROLE

GRUPO IRC

I

II

Figura 16 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do metoprolol (I) e do ácido O-desmetilmetoprolóico (II) (médias $\pm$ EPM dos grupos, símbolos cheios) e dos pacientes WGB (Controle) e ILS (IRC) com fenótipo de metabolizadores lentos da debrisoquina (símbolos abertos)

Figura 17 - Razões de concentrações plasmáticas S-(-)/R-(+)-metoprolol no intervalo de dose. Curvas médias dos grupos (símbolos cheios) e curvas dos pacientes WGB (Controle) e ILS (IRC) com fenótipo de metabolizadores lentos da debrisoquina (símbolos abertos)

Figura 18 – Correlação entre a razão metabólica urinária debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina e a razão de concentrações plasmáticas (3 h) metoprolol/α-hidroximetoprolol (Spearman). □ metabolizadores lentos (PM); ■ metabolizadores rápidos (EM)

TABELA 14 - **Grupo Controle:** disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em plasma e urina. Mediana/média (IC 95%), n=7

Parâmetro	R-(+)-metoprolol	S-(-)-metoprolol
PLASMA		
C _{max} (ng/mL)	90,8 87,0 (63,9-110,1)	101,6* 100,38 (75,6-125,1)
t _{max} (h)	1,5 1,7 (0,7-2,7)	1,5 1,7 (0,8-2,8)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (ng.h/mL)	636,7 669,6 (396,8-942,4)	774,6* 803,6 (488,0-1118,3)
Vd/f (L/kg)	20,2 30,4 (1,7-59,0)	18,5 22,1 (8,5-35,7)
Cl _T /f (L/h/kg)	1,53 1,53 (0,97-2,09)	1,26* 1,27 (0,82-1,73)
t ½ β (h)	10,4 12,2 (5,5-19,0)	11,8 11,4 (7,5-15,3)
β (h ⁻¹)	0,067 0,076 (0,035-0,116)	0,059 0,071 (0,038-0,105)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (S)-(-)/(R)-(+)	1,22 1,21 (1,13-1,29)	
URINA		
Ae (mg)	2,65 3,88 (1,77-5,99)	3,28* 4,41 (2,18-6,64)
Cl _R (L/h/Kg)	0,057 0,068 (0,041-0,094)	0,060 0,063 (0,043-0,083)
Fel/f (%)	1,69 2,48 (1,13-3,83)	2,10* 2,82 (1,40-4,25)
kel (h ⁻¹)	0,125 0,120 (0,076-0,164)	0,131 0,118 (0,075-0,162)
Ae _{(S)-(-)/(R)-(+)}	1,22 1,18 (1,06-1,29)	

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

TABELA 15 – Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em plasma e urina. Mediana/média (IC 95%), n=6

Parâmetro	R-(+)-metoprolol	S-(-)-metoprolol
PLASMA		
C _{max} (ng/mL)	116,1 114,4 (65,6-163,1)	131,4 135,3 (75,4-195,2)
t _{max} (h)	1,25 2,167 (0,001-4,335)	1,25 2,167 (0,001-4,335)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (ng.h/mL)	558,1 651,5 (220,9-1082,0)	645,0* 802,6 (386,9-1318,2)
Vd/f (L/kg)	18,64 18,61 (9,67-27,54)	11,36 16,04 (4,80-27,27)
Cl _T /f (L/h/kg)	1,68 1,69 (1,03-2,35)	1,36* 1,35 (0,87-1,83)
t ½ β (h)	7,65 7,37 (6,40-8,35)	6,97 7,79 (4,73-10,86)
β (h ⁻¹)	0,091 0,095 (0,082-0,108)	0,100 0,098 (0,065-0,132)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (S)-(-)/(R)-(+)	1,26 1,24 (1,15-1,34)	
URINA		
Ae (mg)	2,95 3,26 (1,21-5,32)	3,49 3,65 (1,81-5,49)
Cl _R (L/h/Kg)	0,056 0,059 (0,023-0,095)	0,052 0,055 (0,022-0,087)
Fe/f (%)	1,89 2,09 (0,78-3,40)	2,23 2,34 (1,16-3,51)
kel (h ⁻¹)	0,156 0,165 (0,083-0,247)	0,139 0,165 (0,094-0,236)
Ae _{(S)-(-)/(R)-(+)}	1,18 1,16 (1,02-1,30)	

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

TABELA 16 – **Grupo Controle:** disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%), n=7

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
PLASMA				
C_{max} (ng/mL)	8,6# (5,7-11,6)	9,3 ☆ (6,6-12,0)	19,1 (9,6-28,7)	24,4 (14,2-34,6)
t_{max} (h)	2,4 (1,4-3,4)	2,6 (1,6-3,5)	2,4 (1,4-3,4)	2,5 (1,6-3,4)
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	112,8*# (82,5-143,1)	122,5 ♦ ☆ (89,7-155,2)	246,7 (150,6-342,9)	307,4 (206,6-408,2)
$t_{1/2}$ (h)	11,7 (3,5-20,0)	14,9 (0,9-28,9)	11,3 (6,7-15,8)	9,9 (5,8-14,0)
K_{el} (h ⁻¹)	0,075 (0,041-0,110)	0,069 (0,030-0,108)	0,070 (0,040-0,100)	0,084 (0,037-0,130)
$AUC_{1'R/1'S}^{0-24}$		2,37 (1,78-2,96)		
$AUC_{2S/2R}^{SS}$		1,22 (1,04-1,39)		
URINA				
A_e (mg)	1,09*# (0,62-1,57)	1,23 ♦ ☆ (0,72-1,74)	2,93 (1,65-4,21)	3,85 (2,25-5,44)
F_{el}/f (%)	0,66*# (0,37-0,95)	0,74 ♦ ☆ (0,44-1,05)	1,77 (1,00-2,55)	2,32 (1,36-3,29)
K_{el} (h ⁻¹)	0,073 (0,057-0,088)	0,068 (0,050-0,086)	0,080 (0,057-0,102)	0,082 (0,058-0,105)
Cl_M (L/h/Kg)	0,010*# (0,006-0,015)	0,009 ♦ ☆ (0,005-0,014)	0,027 (0,015-0,039)	0,029 (0,017-0,041)
Cl_R (L/h/Kg)	0,119 (0,081-0,157)	0,121 (0,086-0,157)	0,145 (0,123-0,166)	0,150 (0,120-0,179)
$A_{e_{1'R/1'S}}$		2,96 (2,53-3,40)		
$A_{e_{2S/2R}}$		1,28 (1,15-1,40)		

Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas, $p < 0,05$:

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

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

TABELA 17 - Grupo IRC: disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Média (IC 95%), n=6

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
PLASMA				
C_{max} (ng/mL)	19,7*# (10,5-29,0)	22,2♦☆ (11,8-32,7)	51,0 (34,6-67,5)	63,5 (38,5-88,5)
t_{max} (h)	2,9 (0,5-5,3)	2,9 (0,5-5,3)	2,9 (0,5-5,3)	2,9 (0,5-5,3)
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	269,1*# (163,5-374,8)	343,9♦☆ (203,4-484,3)	736,9† (588,0-885,8)	941,0 (720,6-1161,4)
$t_{1/2}$ (h)	11,6 (8,6-14,6)	10,8 (7,0-14,7)	11,4 (9,7-13,0)	12,3 (9,0-15,6)
Kel (h ⁻¹)	0,063 (0,045-0,080)	0,069 (0,043-0,098)	0,062 (0,052-0,071)	0,058 (0,044-0,073)
$AUC_{0-24}^{SS} \text{ 1'R/1'S}$		2,87 (2,19-3,56)		
$AUC_{0-24}^{SS} \text{ 2S/2R}$		1,27 (1,23-1,32)		
URINA				
A_e (mg)	1,51*# (0,66-2,37)	1,65 ♦☆ (0,93-2,36)	4,08 (2,20-5,97)	4,89 (3,02-6,77)
F_e/f (%)	0,91*# (0,40-1,43)	0,99♦☆ (0,56-1,42)	2,47 (1,33-3,61)	3,01 (1,80-4,22)
Kel (h ⁻¹)	0,178 (0,087-0,444)	0,150 (0,075-0,376)	0,162 (0,070-0,395)	0,074 (0,053-0,095)
Cl_M (L/h/Kg)	0,015*# (0,007-0,022)	0,013♦☆ (0,007-0,019)	0,040 (0,023-0,057)	0,040 (0,023-0,057)
Cl_R (L/h/Kg)	0,060 (0,027-0,093)	0,054 (0,025-0,084)	0,058 (0,032-0,083)	0,057 (0,035-0,078)
$A_{e1'R/1'S}$		2,90 (2,43-3,37)		
$A_{e2S/2R}$		1,21 (1,06-1,37)		

Teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas, $p < 0,05$:

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

♦ 1'R,2S *versus* 1'S,2R; ☆ 1'R,2S *versus* 1'S,2S; † 1'S,2R *versus* 1'S,2S.

TABELA 18 –Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina. Mediana/média (IC 95%), n=7

Parâmetro	(R)-(+)-AODM	(S)-(-)-AODM
PLASMA		
$C_{\max}$ (ng/mL)	733,0 805,6 (563,7-1047,5)	636,3* 627,7 (436,4-819,1)
$t_{\max}$ (h)	2,0 2,6 (1,1-4,0)	2,0 2,6 (1,2-4,1)
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	5054,2 6462,1 (3271,1-9653,1)	4123,4* 4959,9 (3003,8-6916,0)
$t_{1/2}$ (h)	4,80 5,17 (2,44-7,91)	4,40 4,77 (2,83-6,71)
K_{el} (h ⁻¹)	0,144 0,167 (0,094-0,241)	0,157 0,169 (0,107-0,231)
$AUC_{0-24}^{SS} (S)-(-)/(R)-(+)$	0,81 0,80 (0,71-0,88)	
URINA		
A_e (mg)	30,8 34,2 (20,1-48,3)	25,1 29,1 (19,3-38,9)
Cl_R (L/h/Kg)	0,057 0,063 (0,042-0,084)	0,067 0,072 (0,043-0,102)
Cl_M (L/h/Kg)	0,313 0,302 (0,220-0,384)	0,232* 0,222 (0,156-0,288)
F_{el}/f (%)	19,7 21,9 (12,8-30,9)	16,0 18,6 (12,3-24,9)
K_{el} (h ⁻¹)	0,165 0,150 (0,102-0,198)	0,171 0,158 (0,125-0,192)
$A_{e(S)-(-)/(R)-(+)}$	0,94 0,94 (0,72-1,08)	

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

TABELA 19 –Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina. Mediana/média (IC 95%), n=6

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
PLASMA		
C _{max} (ng/mL)	1526,6 1502,4 (1138,3-1866,5)	1355,4* 1258,8 (947,3-1570,3)
t _{max} (h)	2,0 2,2 (1,6-2,9)	2,0 2,2 (1,6-2,9)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (ng.h/mL)	14328,0 16292 (10712-21872)	13346,0* 14627 (9813-19440)
t ½ (h)	6,7 7,4 (5,6-9,2)	7,2 7,5 (6,4-8,6)
Kel (h ⁻¹)	0,103 0,097 (0,076-0,118)	0,097 0,094 (0,081-0,107)
AUC ^{SS} ₀₋₂₄ (S)-(-)/R-(+)	0,91 0,90 (0,85-0,95)	
URINA		
Ae (mg)	42,0 36,8 (23,3-50,3)	35,5* 31,8 (20,3-43,3)
Cl _R (L/h/Kg)	0,028 0,029 (0,013-0,044)	0,033 0,044 (0,008-0,079)
Cl _M (L/h/Kg)	0,406 0,366 (0,220-0,513)	0,284* 0,256 (0,154-0,357)
Fel/f (%)	26,9 23,6 (14,9-32,2)	22,7* 20,4 (13,0-27,7)
Kel (h ⁻¹)	0,087 0,092 (0,049-0,135)	0,094 0,093 (0,051-0,135)
Ae _{(S)-(-)/R-(+)}	0,87 0,87 (0,83-0,91)	

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

TABELA 20 –Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina no Grupo Controle com fenótipo EM, média (IC 95%) n=7, e no paciente WGB com fenótipo PM

Parâmetro	(R)-(+)-metoprolol		(S)-(-)-metoprolol	
	Controle	WGB	Controle	WGB
PLASMA				
$C_{\max}$ (ng/mL)	87,0 (63,9-110,1)	179,86*	100,4 (75,6-125,1)	174,33*
$t_{\max}$ (h)	1,7 (0,7-2,7)	2,0	1,8 (0,8-2,8)	2,0
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	669,6 (396,8-942,4)	1174,16*	803,6 (488,0-1118,3)	1016,48
Vd/f (L/kg)	30,4 (1,7-59,0)	8,67	22,1 (8,5-35,7)	10,49
ClT/f (L/h/kg)	1,53 (0,97-2,09)	0,71*	1,27 (0,82-1,73)	0,82
$t_{1/2\beta}$ (h)	12,2 (5,5-19,0)	8,5	11,4 (7,5-15,3)	8,9
β (h-1)	0,076 (0,035-0,116)	0,081	0,071 (0,038-0,105)	0,078
$AUC_{0-24}^{SS} (S)-(-)/(R)-(+)$	1,21 (1,13-1,29)	0,87*		
URINA				
A_e (mg)	3,88 (1,77-5,99)	11,78*	4,41 (2,18-6,64)	9,57*
Cl_R (L/h/Kg)	0,068 (0,041-0,094)	0,107*	0,063 (0,043-0,083)	0,100*
Fel/f (%)	2,48 (1,13-3,83)	7,54*	2,82 (1,40-4,25)	6,12*
kel (h ⁻¹)	0,120 (0,076-0,164)	0,147	0,118 (0,075-0,162)	0,157
$A_e (S)-(-)/(R)-(+)$	1,18 (1,06-1,29)	0,81*		

* Valores fora do intervalo de confiança de 95% do Grupo Controle.

TABELA 21– Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma e urina no Grupo Controle com fenótipo EM, média (IC 95%) n=7, e no paciente WGB com fenótipo PM

Parâmetro	(R)-(+)-AODM		(S)-(-)-AODM	
	Controle	WGB	Controle	WGB
PLASMA				
$C_{\max}$ (ng/mL)	805,6 (563,7-1047,5)	266,1*	627,7 (436,4-819,1)	354,3*
$t_{\max}$ (h)	2,6 (1,1-4,0)	2,0	2,6 (1,2-4,1)	2,0
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	6462,1 (3271,1-9653,1)	1908,0*	4959,9 (3003,8-6916,0)	2913,2*
$t_{1/2}$ (h)	5,17 (2,44-7,91)	4,6	4,77 (2,83-6,71)	5,0
K_{el} (h^{-1})	0,167 (0,094-0,241)	0,151	0,169 (0,107-0,231)	0,126
$AUC_{0-24}^{SS} (S)-(-)/(R)-(+)$	0,80 (0,71-0,88)	1,53*		
URINA				
A_e (mg)	34,2 (20,1-48,3)	15,2*	29,1 (19,3-38,9)	18,2*
Cl_R (L/h/Kg)	0,063 (0,042-0,084)	0,084	0,072 (0,043-0,102)	0,066
Cl_M (L/h/Kg)	0,302 (0,220-0,384)	0,069*	0,222 (0,156-0,288)	0,095*
F_{el}/f (%)	21,9 (12,8-30,9)	9,7*	18,6 (12,3-24,9)	11,7*
k_{el} (h^{-1})	0,150 (0,102-0,198)	0,139	0,158 (0,125-0,192)	0,141
$A_{e(S)-(-)/(R)-(+)}$	0,90 (0,72-1,08)	1,20*		

* Valores fora do intervalo de confiança de 95% do Grupo Controle.

TABELA 22 –Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina no Grupo IRC fenótipo EM, média (IC 95%) n=6, e no paciente ILS com fenótipo PM

Parâmetro	(R)-(+)-metoprolol		(S)-(-)-metoprolol	
	IRC	ILS	IRC	ILS
PLASMA				
$C_{\max}$ (ng/mL)	114,4 (65,6-163,1)	316,4*	135,3 (75,4-195,2)	270,3*
$t_{\max}$ (h)	2,2 (0,001-4,335)	2,0	2,2 (0,001-4,335)	2,0
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	651,5 (220,9-1082,0)	3990,9*	802,6 (386,9-1318,2)	2891,4*
Vd/f (L/kg)	18,61 (9,67-27,54)	4,12*	16,04 (4,80-27,27)	4,18*
Cl_T/f (L/h/kg)	1,69 (1,03-2,35)	0,28*	1,35 (0,87-1,83)	0,39*
$t_{1/2\beta}$ (h)	7,37 (6,40-8,35)	10,05*	7,79 (4,73-10,86)	7,4
β (h^{-1})	0,095 (0,082-0,108)	0,069*	0,098 (0,065-0,132)	0,094
$AUC_{0-24(S)-/(R)-(+)}^{SS}$	1,24 (1,15-1,34)	0,72*		
URINA				
A_e (mg)	3,26 (1,21-5,32)	12,94*	3,65 (1,81-5,49)	8,98*
Cl_R (L/h/Kg)	0,059 (0,023-0,095)	0,047	0,055 (0,022-0,087)	0,045
Fel/f (%)	2,09 (0,78-3,40)	8,29*	2,34 (1,16-3,51)	5,75*
kel (h^{-1})	0,165 (0,083-0,247)	0,096	0,165 (0,094-0,236)	0,122
$Ae_{(S)-/(R)-(+)}$	1,16 (1,02-1,30)	0,69*		

* Valores fora do intervalo de confiança de 95% do Grupo IRC.

TABELA 23 – Disposição cinética enantiosseletiva dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina no Grupo IRC com fenótipo EM, média (IC 95%) n=6, e no paciente ILS com fenótipo PM

Parâmetro	(R)-(+)-AODM		(S)-(-)-AODM	
	IRC	ILS	IRC	ILS
PLASMA				
$C_{\max}$ (ng/mL)	1502,4 (1138,3-1866,5)	705,1*	1258,8* (947,3-1570,3)	672,0*
$t_{\max}$ (h)	2,2 (1,6-2,9)	6,0*	2,2 (1,6-2,9)	6,0*
AUC_{0-24}^{SS} (ng.h/mL)	16292,0 (10712,0-21872,0)	14019,3	14627,0* (9813,0-19440,0)	12091,0
$t_{1/2}$ (h)	7,4 (5,6-9,2)	12,3*	7,5 (6,4-8,6)	11,3*
K_{el} (h ⁻¹)	0,097 (0,076-0,118)	0,056*	0,094 (0,081-0,107)	0,061*
$AUC_{0-24}^{SS} (S)-(-)/(R)-(+)$	0,90 (0,85-0,95)		0,86	
URINA				
A_e (mg)	36,8 (23,3-50,3)	43,4	31,8* (20,3-43,3)	49,5*
Cl_R (L/h/Kg)	0,029 (0,013-0,044)	0,045*	0,044 (0,008-0,079)	0,059
Cl_M (L/h/Kg)	0,366 (0,220-0,513)	0,079*	0,256* (0,154-0,357)	0,124*
Fe/f (%)	23,6 (14,9-32,2)	27,8	20,4* (13,0-27,7)	31,7*
kel (h ⁻¹)	0,092 (0,049-0,135)	0,033*	0,093 (0,051-0,135)	0,041*
$A_{e(S)-(-)/(R)-(+)}$	0,87 (0,83-0,91)		1,14*	

* Valores fora do intervalo de confiança de 95% do Grupo IRC.

V DISCUSSÃO

O presente estudo investiga a influência da insuficiência renal no metabolismo estereosseletivo do metoprolol administrado em regime de doses múltiplas, sob forma racêmica, a pacientes com hipertensão arterial sistêmica primária e pacientes com hipertensão arterial sistêmica primária portadores de insuficiência renal crônica secundária à nefropatia hipertensiva, de ambos os sexos, com idade entre 42 e 64 anos e fenotipados como metabolizadores rápidos da debrisoquina. O estudo também apresenta a farmacocinética do metoprolol e seus metabólitos em dois pacientes com hipertensão arterial sistêmica primária fenotipados como metabolizadores lentos da debrisoquina.

Em vista da importância do sistema nervoso simpático como cofator na hipertensão em pacientes com insuficiência renal crônica e considerando a dúvida ainda presente da relação entre a administração de β -bloqueadores e o nível de noradrenalina plasmática²³, foi realizada a dosagem da noradrenalina plasmática nos pacientes incluídos neste estudo. Apesar de alguns trabalhos mostrarem que a concentração plasmática de noradrenalina não é afetada pela administração de β -bloqueadores^{23,48}, um trabalho realizado com 30-150 mg/dia de metoprolol em pacientes portadores de insuficiência cardíaca crônica mostrou redução das concentrações plasmáticas de noradrenalina após um mês de tratamento, embora as concentrações tenham retornado aos níveis basais após seis meses de tratamento⁶¹. Os resultados obtidos em nosso estudo, realizando dosagem de noradrenalina nas fases basal, placebo e com três doses de tartarato de metoprolol (50, 100 e 200 mg/24h) mostraram não haver relação entre a administração de metoprolol e a concentração de noradrenalina plasmática. Não houve também alteração das concentrações plasmáticas de noradrenalina como consequência da insuficiência renal (TABELA 12, Figura 9).

O metoprolol, um bloqueador β -adrenérgico sem atividade simpatomimética intrínseca, produz uma redução inicial no débito cardíaco, e uma elevação reflexo-induzida na resistência vascular periférica, sem

alteração final na pressão arterial. Nos pacientes que respondem com uma redução da pressão sanguínea, a resistência periférica retorna aos valores basais em algumas horas a alguns dias. É essa normalização retardada da resistência vascular periférica, diante de um débito cardíaco persistentemente reduzido, a responsável pela redução da pressão arterial²¹. Os dados obtidos na monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) nas fases Basal e após administração de placebo e três doses de metoprolol evidenciaram diferença com significância estatística entre as fases Basal e Placebo *versus* a Fase 3 (200 mg de tartarato de metoprolol) apenas para a frequência cardíaca (TABELA 13, Figura 10). A não observação de diferenças na pressão arterial em função da administração de metoprolol em diferentes regimes de dosagem pode ser conseqüente do baixo número de pacientes incluídos em cada grupo e do relativamente curto período de administração do anti-hipertensivo para um estudo farmacodinâmico. Na Figura 11 podemos observar que a maior queda na frequência cardíaca durante o intervalo de dose coincide com o pico de concentração do (S)-(-)-metoprolol no plasma e que há uma tendência de redução da frequência cardíaca em função do aumento da dose de metoprolol, embora a análise estatística não tenha evidenciado diferença entre as Fases 1, 2 e 3 do protocolo clínico. Não foram observadas diferenças nos parâmetros cardiovasculares entre os grupos controle e IRC, mostrando que a dose de metoprolol não precisa ser ajustada em razão desta patologia.

Os pacientes investigados portadores de hipertensão arterial sistêmica primária associada ou não à insuficiência renal crônica secundária à nefropatia hipertensiva foram incluídos nos Grupos IRC ou Controle, respectivamente, de acordo com a taxa de filtração glomerular.

A taxa de filtração glomerular pode ser estimada através do *clearance* de uma substância marcadora. A substância ideal deve ser livremente filtrada pelo glomérulo, excretada apenas através de filtração glomerular, não devendo ser reabsorvida ou secretada pelos túbulos nem se ligar às proteínas plasmáticas. A creatinina, produto final do metabolismo da creatina, preenche

a maioria, mas não todos os requisitos de um marcador ideal da taxa de filtração glomerular: é livremente filtrada pelo glomérulo, não liga-se às proteínas plasmáticas, não é metabolizada nos rins, sendo facilmente mensurável no plasma e na urina. No entanto, a creatinina é apenas um marcador aproximado da taxa de filtração glomerular, pois apesar de ser excretada principalmente por filtração glomerular, é também excretada por secreção tubular, aproximadamente 10-20% em voluntários sadios^{15,56}.

Na insuficiência renal crônica o *clearance* da creatinina endógena constitui um indicador pouco preciso da taxa de filtração glomerular. Nessa situação, a filtração glomerular é superestimada em razão do favorecimento da secreção tubular em grau variável e pouco previsível^{55,56}. O *clearance* da creatinina endógena não indica de maneira precisa o grau de comprometimento da função renal, mas diferencia a função renal normal da função moderada a severamente reduzida⁵⁶, preenchendo as necessidades da presente investigação. Vale ressaltar que, em razão das dificuldades técnicas inerentes à administração de marcadores exógenos da filtração glomerular, o *clearance* da creatinina endógena, apesar das limitações, continua sendo amplamente empregado nos estudos que envolvem pacientes portadores ou não de disfunções renais.

O metoprolol e seus metabólitos α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico foram avaliados no estado de equilíbrio, após administração *p.o.* de 200 mg de tartarato de metoprolol racêmico, no intervalo de dose de 24 h. O estado de equilíbrio foi assegurado pela administração de doses múltiplas do metoprolol durante 7 dias. Estudos anteriores demonstram que o estado de equilíbrio é atingido após 5 dias de administração *p.o.* do metoprolol⁵⁷.

O metoprolol é um fármaco administrado sob a forma racêmica e eliminado principalmente por metabolismo oxidativo, traduzido por O-desmetilação, α -hidroxilação e N-desalquilação, sendo 70% metabolizado via CYP2D6^{7,30}. A variabilidade intra e interindividual na farmacocinética do

metoprolol é conseqüente, principalmente, da atividade do polimórfico CYP2D6, o que justifica a determinação do fenótipo dos pacientes envolvidos na presente investigação⁶⁸. Para análise do fenótipo de oxidação dependente do CYP2D6 a debrisoquina tem sido empregada como fármaco marcador por ser eliminada, no homem, principalmente por metabolismo via CYP2D6, com formação da 4-hidroxidebrisoquina^{10,67}. Os pacientes incluídos no estudo foram submetidos ao teste da debrisoquina pois, apenas os metabolizadores rápidos da debrisoquina apresentam enantiosseletividade na disposição cinética do metoprolol e formação do α -hidroximetoprolol^{31,39,54}. Em pacientes com insuficiência renal há uma preocupação na determinação do fenótipo usando a razão metabólica ou a razão de recuperação da debrisoquina na urina como índice da atividade do CYP2D6. Rostami-Hodjegan et al. (1999)⁶⁰ mostram que esta preocupação não deve ser relevante uma vez que a redução da atividade enzimática compensa a redução do *clearance* renal deste fármaco. Kaisary et al. (1987)³³ mostraram que a razão de recuperação é proporcional a atividade do CYP2D6 e apresenta melhor relação com a formação da 4-hidroxidebrisoquina. No entanto, Rostami-Hodjegan et al. (1999)⁶⁰ sugerem que a razão metabólica da debrisoquina deve ser preferencialmente empregada em pacientes com insuficiência renal crônica pois a razão de recuperação urinária é mais sensível a erros de fenotipagem decorrentes de alterações na função renal.

O método analítico empregado que utiliza a coluna RP-Select-B e detector por fluorescência permitiu a análise simultânea da debrisoquina e seu metabólito, com limites de confiança compatíveis com a aplicação em estudos de metabolismo¹⁰. Os pacientes incluídos no estudo apresentaram razões metabólicas debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina inferiores a 12,6 e razões de recuperação da debrisoquina superiores a 0,12, sendo portanto fenotipados como metabolizadores rápidos da debrisoquina (TABELA 11 e Figura 8). Os pacientes WGB e ILS apresentaram razões metabólicas debrisoquina/4-hidroxidebrisoquina superiores a 12,6 e razões de recuperação da debrisoquina

inferiores a 0,12 e foram fenotipados como metabolizadores lentos (TABELA 11 e Figura 8). Apesar de excluídos dos Grupos Controle e IRC, respectivamente, o metabolismo do metoprolol foi investigado nestes pacientes a fim de facilitar o entendimento das outras vias metabólicas envolvidas no metabolismo do metoprolol. Na Figura 18 pode-se observar a forte correlação existente entre a α -hidroxilação do metoprolol e a 4-hidroxilação da debrisoquina nos pacientes investigados ($r=0,9246$) assim como a distinção entre os metabolizadores rápidos e lentos com o uso dos dois fármacos. Esses resultados mostram que as duas vias metabólicas são controladas, essencialmente, pela mesma enzima (CYP2D6) e que tanto a debrisoquina como o metoprolol podem ser empregados como fármacos marcadores do CYP2D6 em brasileiros brancos. A correlação entre a α -hidroxilação do metoprolol e a 4-hidroxilação da debrisoquina também foi observada nas populações britânica, japonesa e turca, embora metabolizadores lentos da debrisoquina não foram fenotipados como metabolizadores lentos do metoprolol em nigerianos e em populações sul africanas⁴.

A investigação do metabolismo estereosseletivo do metoprolol exige métodos de análise dos enantiômeros do metoprolol, dos isômeros do α -hidroximetoprolol e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e na urina de alta sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Os métodos de análise dos enantiômeros do metoprolol em plasma e urina foram apresentados em um trabalho anterior do grupo^{8,36}. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação dos métodos estereosseletivos de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina^{11,12}.

Os trabalhos da literatura apresentam a separação dos enantiômeros do metoprolol e dos diastereoisômeros do α -hidroximetoprolol (1'R,2R+1'S,2R; 1'R,2S+1'S,2S) empregando derivatização quiral com isotiocianato de 2,3,4,5-tetra-O-acetil- β -d-glucopiranosil (GITC)⁶³ ou coluna quiral Chirobiotic® T⁵⁰.

A separação dos isômeros do α -hidroximetoprolol foi relatada apenas por Balmér et al. (1991)³ através de método direto com emprego da coluna de fase estacionária quiral Chiralcel® OD com relato de influência da temperatura e do conteúdo de água da fase móvel na separação dos isômeros. A separação dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol foi realizada utilizando a coluna quiral Chiralpak® AD e detector por fluorescência (λ_{exc} = 229 nm; λ_{em} = 298 nm). A Figura 3 exibe a separação dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina. Pode ser observado que nenhum componente endógeno do plasma ou da urina interfere nos métodos analíticos. Os outros metabólitos do metoprolol também não são interferentes do método analítico (TABELA 6).

A ordem de eluição dos enantiômeros do metoprolol na sequência (R)- (+) e (S)-(-) foi estabelecida após a injeção dos enantiômeros puros. O metabólito α -hidroximetoprolol apresenta dois carbonos assimétricos e, conseqüentemente, 4 isômeros. A stereoquímica do centro hidroxilado do anel benzílico do α -hidroximetoprolol foi estabelecida por Shetty & Nelson (1988)⁶⁵, através da síntese dos isômeros e análise dos espectros de dicroísmo circular. Existe uma boa correlação entre o sinal do efeito Cotton da banda 1L_a (transição através de comprimento de onda curto) e a configuração absoluta dos fenilcarbinóis, que não variam com o substituinte no anel aromático. No entanto, o sinal do efeito Cotton associado com a banda 1L_b (transição através de comprimento de onda longo) é altamente dependente do substituinte ligado ao anel aromático. Os isômeros 1'S exibem um efeito Cotton negativo em 227nm e um efeito Cotton positivo em 280 nm. A ordem de eluição dos isômeros foi determinada após isolamento destes e obtenção dos espectros de dicroísmo circular. Os espectros foram comparados com o espectro obtido da mistura com stereoquímica definida 1'S:1'R (70:30), que apresentou um efeito Cotton positivo em 280 nm. Nos espectros apresentados na Figura 6 pode-se observar que os isômeros 1 e 2 (picos 3 e 4, Figura 3) apresentam um

efeito Cotton positivo em 280 nm, sendo identificados com a configuração 1'S, enquanto os isômeros 3 e 4 (picos 5 e 6, Figura 3) apresentam um efeito Cotton negativo na mesma região, tendo portanto a configuração 1'R⁶⁵. A injeção dos isômeros isolados na coluna Chiralcel® OD e a comparação com dados da literatura permitiram a definição do centro quiral originado do metoprolol. A ordem de eluição dos isômeros foi portanto definida como 1'S,2R-, 1'S,2S-, 1'R,2R- e 1'R,2S-.

As recuperações dos isômeros do α -hidroximetoprolol de amostras de plasma, através de extração em fase sólida foram superiores às obtidas na extração com diclorometano:éter diisopropílico (93,7 *versus* 63,6%) e nos dois métodos, independentes das concentrações (TABELA 2). Estudos anteriores utilizam diclorometano^{39,40,63}, éter dietílico³, mistura diclorometano:éter dietílico³¹ em meio alcalino com recuperação superior a 80% ou ainda extração em colunas de fase sólida C18²⁴ e C2⁴⁹ que possibilitam a eliminação de interferentes endógenos do plasma resultando em maior sensibilidade.

As curvas de calibração área do pico *versus* concentração dos isômeros do α -hidroximetoprolol (2-200 ng/mL de plasma e 0,125- 25 μ g/ mL urina) mostraram linearidade nesses intervalos, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os amplos intervalos lineares dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina (TABELA 2) abrangem todas as concentrações experimentadas. O limite de quantificação de 2 ng/mL de plasma e 125 ng/mL de urina permitiram a análise de amostras de pacientes até 36 h após a administração do metoprolol. Esses resultados são superiores aos encontrados na literatura que variam de 2,5-10 ng/mL de plasma^{3,17,27}. Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão inter e intra-ensaios (TABELAS 3 e 4) foram inferiores a 15% para os dois métodos, assegurando a precisão e exatidão dos resultados. A adição de um padrão interno à análise seqüencial de 6 isômeros não foi necessária devido a alta precisão e exatidão do método analítico. O estudo de estabilidade

assegurou os armazenamento das amostras de plasma e urina por até 45 dias após a colheita (TABELA 5). O teste de racemização mostrou não haver interconversão dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e urina durante o processo de extração. A análise da seletividade (TABELA 6) demonstra que os métodos podem ser empregados para aplicação em estudos de metabolismo em pacientes hipertensos submetidos a terapia crônica com metoprolol associado a outros fármacos.

A separação dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foi realizada em coluna de fase estacionária quiral Chiralcel® OD-R e os picos detectados por fluorescência (λ_{exc} = 229 nm; λ_{em} = 298 nm). A Figura 4 exibe a separação dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina. Pode ser observado que os componentes endógenos não interferem nos métodos analíticos. O metoprolol e os outros metabólitos do metoprolol são extraídos do plasma e da urina com o solvente orgânico no processo de purificação e, portanto, não interferem na análise. Não houve perda dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico das amostras de urina no processo de purificação (TABELA 7). A análise enantiosseletiva direta do ácido O-desmetilmetoprolóico em urina foi descrita por Kim et al. (2000)³⁴ empregando a coluna Sumichiral® OA-4900 e detecção por fluorescência. Embora a resolução dos enantiômeros tenha sido efetiva, os limites de confiança do método para aplicação em estudos farmacocinéticos não foram apresentados. A mesma coluna foi empregada por Jung et al (2000)³³ para analisar os enantiômeros do metabólito ácido em uma solução preparada por síntese. A análise enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em urina foi relatada por Li et al. (1995)⁴² através do bloqueio do grupo carboxila por esterificação com BF₃ em metanol, purificação por extração líquido-sólido, derivatização com (-)-cloroformiato de mentila e resolução dos derivados diastereoisoméricos em coluna de fase reversa C18. Os enantiômeros deste metabólito foram também diretamente analisados em urina por eletroforese

capilar usando CM- β -ciclodextrina como seletor quiral⁴³. A análise deste metabólito em urina tem sido realizada através da diluição da urina com água¹⁹ ou com a fase móvel⁴⁰ ou ainda através de extração em fase sólida, empregando colunas C18⁴². A análise enantiosseletiva direta do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma foi descrita por Mistry et al. (2002)⁵¹ usando a coluna Chirobiotic® T e detecção por fluorescência após extração em fase sólida.

A ordem de eluição foi determinada empregando um detector por dicroísmo circular para identificar os dois enantiômeros resolvidos sem, e após o procedimento de derivatização. Podemos observar na Figura 7 que o primeiro enantiômero (5,23 min) que elui da coluna Chiralcel® OD-H apresenta um sinal positivo e o segundo enantiômero (6,78 min) apresenta um sinal negativo no cromatograma de dicroísmo circular em 274 nm. Os espectros dos enantiômeros puros do metoprolol apresentam um sinal positivo em 274 nm para o (R)-(+)-metoprolol e um sinal negativo no mesmo comprimento de onda para o (S)-(-)-metoprolol. Com base na discreta diferença nas estruturas do metoprolol e seu metabólito ácido, sem alteração do centro quiral, podemos assumir a mesma configuração absoluta para os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico, determinando a ordem de eluição como sendo (R)-(+)- e (S)-(-)-AODM para os dois sistemas cromatográficos (colunas Chiralcel® OD-R e Chiralcel® OD-H).

As curvas de calibração área do pico *versus* concentração dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (41,25-1650 ng/mL de plasma e 0,5-220 μ g/ mL urina) mostraram linearidade nesses intervalos, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os limites de quantificação de 16,5 ng/mL de plasma e 0,5 μ g/ mL de urina permitiram a análise de amostras de pacientes até 36 h após a administração do metoprolol e mostrou sensibilidade vinte vezes maior que o método desenvolvido por Li et al. (1995)⁴² em urina. Os valores de inexatidão e os coeficientes de variação

inferiores a 15% (TABELA 8) asseguram a precisão e exatidão dos métodos. A alta seletividade (TABELA 9) demonstra que os métodos podem ser empregados em estudos de metabolismo em pacientes hipertensos submetidos à terapia crônica com metoprolol em combinação com outros fármacos. A estabilidade das amostras foi assegurada por 45 dias e após três ciclos de congelamento e descongelamento (TABELA 10).

Os limites de confiança apresentados permitem concluir que os métodos desenvolvidos para análise estereosseletiva dos metabólitos α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico são compatíveis com o estudo de doses múltiplas de metoprolol racêmico em pacientes hipertensos e hipertensos com insuficiência renal crônica.

O metoprolol foi administrado aos pacientes apenas por via *p.o.*, com conseqüente impossibilidade da determinação da biodisponibilidade. Apesar de estudos anteriores fixarem a biodisponibilidade do metoprolol racêmico em $38 \pm 14,8\%^{21}$, os parâmetros farmacocinéticos dependentes da biodisponibilidade como o Cl_T , Fel e o V_d , são calculados de maneira mais precisa como valores aparentes, ou seja, Cl_T/f , Fel/f e V_d/f uma vez que não há dados relativos a biodisponibilidade dos enantiômeros isolados.

No Grupo Controle os parâmetros farmacocinéticos do metoprolol, calculados para os pacientes nas fases de absorção, distribuição e eliminação, mostraram que as curvas de concentração plasmática *versus* tempo do (R)-(+)- e (S)-(-)-metoprolol apresentam o mesmo decaimento (Figura 12-I), com valores de meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) e constante de velocidade de eliminação (β) estatisticamente não diferentes (TABELA 14). O tempo para atingir C_{max} (t_{max}) também não apresentou diferença com significância estatística entre os dois enantiômeros. Os valores de C_{max} , AUC^{SS}_{0-24} , Cl_T/f , Ae e Fel/f apresentaram diferenças com significância estatística entre os enantiômeros do metoprolol no Grupo Controle, confirmando a enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol⁹. A observação de

maiores áreas sob as curvas concentração plasmática *versus* tempo (AUC_{0-24}^{SS}) do (S)-(-)-metoprolol em relação ao seu antípoda ($p < 0,05$) foi consequência do menor Cl_T/f para este enantiômero e resultou nas médias das razões $AUC_{(S)-(-)}/AUC_{(R)-(+)}$ de 1,21. Razões enantioméricas de 1,39 foram relatadas por Johnson & Burlew (1996)³⁰ na investigação de voluntários sadios tratados com dose única de metoprolol racêmico e razões de 1,29 foram relatadas por Cerqueira et al. (1999)⁹ em um estudo de doses múltiplas de metoprolol racêmico a pacientes hipertensos com fenótipo de metabolizadores rápidos da debrisoquina.

A formação do metabólito α -hidroximetoprolol mostrou ser estereosseletiva no Grupo Controle, favorecendo a formação do novo centro quiral 1'R independente da configuração do centro quiral da cadeia propanolamínica (Figura 12-II). Na TABELA 16 pode ser observada diferença com significância estatística ($p < 0,05$) entre os isômeros 1'S *versus* 1'R nos parâmetros C_{max} , AUC_{0-24}^{SS} , Ae^{0-24} , Fel/f e Cl_M , com grande favorecimento dos isômeros 1'R ($AUC_{1'R}/AUC_{1'S} = 2,37$). O favorecimento da formação do centro 1'R está de acordo com os estudos da literatura em microsomas de fígado humano⁵². O mesmo estudo demonstra a α -hidroxilação preferencial do enantiômero (S)-(-)-metoprolol. Em nosso estudo foram observadas razões de AUC_{2S}/AUC_{2R} com valores superiores a unidade ($AUC_{2S}/AUC_{2R} = 1,22$), no entanto não houve diferença com significância estatística entre os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros 2R *versus* 2S (TABELA 16).

A formação do metabólito AODM apresentou enantiosseletividade (TABELA 18, Figura 12-III), com favorecimento da formação do (R)-(+)-AODM, com observação de maiores valores de AUC_{0-24}^{SS} , C_{max} e Cl_M para este enantiômero ($AUC_{(S)-(-)}/AUC_{(R)-(+)} = 0,81$). Estudos anteriores em microsomas de fígado humano^{52,54} e em voluntários sadios tratados com solução oral de metoprolol racêmico⁵¹ indicam o favorecimento na formação do (R)-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico ($AUC_{(S)-(-)}/AUC_{(R)-(+)} = 0,85$)⁵¹.

O Grupo IRC apresentou a estereosseletividade no metabolismo do metoprolol muito semelhante ao Grupo Controle, com acúmulo plasmático do (S)-(-)-metoprolol ($AUC_{(S)-(-)}/AUC_{(R)-(+)} = 1,24$; TABELA 14; Figura 12-I). A formação dos metabólitos α -hidroximetoprolol ($AUC_{1,R}/AUC_{1,S} = 2,87$; $AUC_{2,S}/AUC_{2,R} = 1,27$; TABELA 17; Figura 12-II) e ácido O-desmetilmetoprolóico ($AUC_{(S)-(-)}/AUC_{(R)-(+)} = 0,91$; TABELA 19; Figura 12-III) seguiu exatamente o mesmo padrão observado no Grupo Controle.

A via de O-desmetilação é a principal via metabólica do metoprolol, em torno de 65% da dose, enquanto a α -hidroxilação é responsável por eliminar não mais que 10% da dose de metoprolol. A presença de enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol e na formação do ácido O-desmetilmetoprolóico, com favorecimento na formação do enantiômero (R)-(+)-, para os Grupos Controle e IRC sugere que a O-desmetilação é a via metabólica responsável pelo acúmulo plasmático do metabólito (S)-(-)-metoprolol (Figura 17) em pacientes hipertensos metabolizadores rápidos da debrisoquina.

Devido a baixa excreção renal do metoprolol inalterado (<10%) e a baixa ligação às proteínas plasmáticas não foi observada diferença com significância estatística dos parâmetros farmacocinéticos do metoprolol entre os Grupos Controle e IRC (TABELAS 14 e 15). Entretanto, ao comparar as curvas de concentração plasmática *versus* tempo dos Grupos Controle e IRC (Figura 12-I) pode-se observar uma tendência de redução da $t_{1/2\beta}$ de ambos enantiômeros do metoprolol nos pacientes portadores de IRC, que não é constatada estatisticamente devido à alta variabilidade interindividual e o pequeno número de pacientes incluídos em cada grupo. O estudo da disposição cinética dos metabólitos do metoprolol fornece dados que possibilitam o entendimento deste resultado.

Os pacientes portadores de insuficiência renal crônica apresentam acúmulo plasmático dos quatro isômeros do α -hidroximetoprolol,

demonstrado por valores de $C_{\max}$ e AUC_{0-24}^{SS} aproximadamente 2,5 vezes maiores que os valores do Grupo Controle (TABELAS 16 e 17; Figura 15). A observação de valores iguais de A_e , K_{el} e F_{el} para os dois grupos, indica que o acúmulo do α -hidroximetoprolol, observado nos pacientes portadores de IRC, não é devido a redução na excreção renal deste metabólito, e que a redução de aproximadamente 2,5 vezes dos valores de Cl_R para os quatro isômeros no Grupo IRC é consequência direta do aumento de AUC_{0-24}^{SS} . Sugere-se portanto que o acúmulo do α -hidroximetoprolol nos pacientes portadores de IRC é decorrente de alterações no metabolismo do metoprolol. Nas curvas de razões de concentrações plasmáticas 2R- α -hidroximetoprolol/R-(+)-metoprolol e 2S- α -hidroximetoprolol/(S)-(-)-metoprolol *versus* tempo (Figura 14-I) pode-se observar uma queda das razões em função da fase de absorção do metoprolol (0-1h) e, a partir desta fase, um aumento progressivo nas razões, que pode ser interpretado como formação do α -hidroximetoprolol e eliminação do metoprolol a uma velocidade mais rápida que a eliminação do α -hidroximetoprolol. Ao compararmos os grupos Controle e IRC, podemos observar curvas com o mesmo perfil, porém razões superiores no Grupo IRC, decorrentes do acúmulo plasmático deste metabólito nestes pacientes. Baseando-se nesses resultados podemos concluir que a enzima responsável por esta via metabólica, o CYP2D6, não está induzida ou inibida nesta patologia. Vale ressaltar que não há relatos na literatura sobre a indução do CYP2D6 em nenhuma circunstância. Logo, as alterações na principal via metabólica do metoprolol (O-desmetilação) devem explicar as alterações observadas na α -hidroxilação dependente do CYP2D6.

Ao comparar a disposição cinética do AODM nos Grupos Controle e IRC, pode-se observar que os pacientes portadores de insuficiência renal crônica acumulam ambos enantiômeros do metabólito ácido, demonstrado pelos valores superiores de AUC_{0-24}^{SS} e $C_{\max}$ (TABELAS 18 e 19; Figura 15). Esse acúmulo pode ser atribuído parcialmente à redução na excreção renal

(Cl_R) no Grupo IRC. No entanto, a redução de 50 % no Cl_R não explica o acúmulo plasmático de 3-4 vezes do ácido O-desmetilmetoprolóico nesse Grupo, sugerindo que outras vias de eliminação do metoprolol além da excreção renal estão alteradas nesta patologia. Nas curvas de razões de concentrações plasmáticas (R)-(+)-AODM/ (R)-(+)-metoprolol e (S)-(-)-AODM/(S)-(-)-metoprolol *versus* tempo para o Grupo Controle (Figura 14-II) pode-se observar uma queda das razões no início da fase de absorção do metoprolol (0-30 min), um aumento progressivo nas razões na fase de formação do metabólito ácido (até 3h) e posteriormente uma nova queda até o final do intervalo de dose (24h), justificada pela eliminação do metabólito ácido a uma velocidade maior que a eliminação do metoprolol ($K_{el} \text{ AODM} / \beta \text{ metoprolol} \cong 3$; TABELAS 14 e 18). O Grupo IRC (Figura 14-II), apresenta curvas com o perfil bastante diferente das curvas obtidas no Grupo Controle. Após a queda na fase de absorção do metoprolol ocorre um aumento progressivo das razões até o final do intervalo de dose. As constantes de velocidade de eliminação para o metoprolol e o AODM são muito semelhantes no Grupo IRC ($\sim 0,095\text{h}^{-1}$; TABELAS 15 e 19), não explicando este aumento. Baseado neste resultado e considerando, no Grupo IRC, a tendência de redução da $t_{1/2\beta}$ do metoprolol e o acúmulo plasmático do AODM muito superior à redução no seu Cl_R, sugerimos indução da isoforma do CYP responsável pela formação do metabólito ácido nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica. A indução de isoformas do CYP em pacientes portadores de insuficiência renal crônica já foi relatada por outros autores³⁵. A formação do AODM é dependente do CYP2D6 e de outras enzimas, incluindo o CYP3A intestinal, que diferem do CYP2D6 pela enantiosseletividade e baixa afinidade aos substratos^{46,54}. O acúmulo plasmático do metabólito ácido provavelmente desloca o equilíbrio das reações enzimáticas no sentido do favorecimento do metoprolol disponível para a α -hidroxilação, explicando

portanto o acúmulo do α -hidroximetoprolol não dependente de indução enzimática.

Os pacientes WGB e ILS, fenotipados como metabolizadores lentos da debrisoquina com baixa ou nenhuma atividade do CYP2D6, apresentaram ausência de formação do α -hidroximetoprolol e redução na formação de ambos enantiômeros do AODM (Figura 16). Pode ser observado também nestes pacientes o acúmulo plasmático do (R)-(+)-metoprolol (Figura 17; TABELAS 20 e 22), confirmando os resultados obtidos em um estudo com microsomas de fígado humano, no qual a outra isoforma do CYP responsável pela formação do AODM preferencialmente O-desmetila o (S)-(-)-metoprolol⁵⁴. Ao compararmos os dois pacientes, podemos observar que o paciente portador de IRC tem maior formação do AODM que o paciente com função renal normal (TABELAS 21 e 23), o que sugere a indução da outra isoforma do CYP na insuficiência renal crônica, uma vez que o CYP2D6 está ausente ou inativo nestes pacientes.

As diferenças entre os Grupos Controle e IRC na formação dos metabólitos α -hidroximetoprolol e AODM sugerem que a insuficiência renal crônica não induz o CYP2D6, mas induz a atividade do outro sistema enzimático responsável pela formação do AODM, no entanto, esta indução não é suficiente para alterar a enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol.

VI CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na avaliação do metabolismo do metoprolol administrado sob forma racêmica em regime de doses múltiplas *p.o.* a pacientes com hipertensão arterial sistêmica primária e pacientes com hipertensão arterial sistêmica primária portadores de insuficiência renal crônica secundária à hipertensão, fenotipados como metabolizadores rápidos ou lentos da debrisoquina, permitiram inferir as seguintes conclusões:

MÉTODOS ANALÍTICOS ESTEREOSSELETIVOS

- Os métodos desenvolvidos para a análise estereosseletiva do α -hidroximetoprolol e do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e urina apresentam limites de confiança compatíveis com estudo de metabolismo estereosseletivo do metoprolol em regime de doses múltiplas.

METABOLISMO ESTEREOSSELETIVO DO METOPROLOL

- A disposição cinética do metoprolol é enantiosseletiva em pacientes hipertensos com função renal normal e pacientes hipertensos com insuficiência renal crônica, com observação de maiores concentrações plasmáticas (AUC^{0-24}) e menor *clearance* total aparente para o (S)-(-)-metoprolol.
- A formação do α -hidroximetoprolol é estereosseletiva com favorecimento do novo centro quiral 1'R para ambos enantiômeros do metoprolol em pacientes hipertensos com função renal normal ou hipertensos com insuficiência renal crônica.
- A formação do ácido O-desmetilmetoprolóico é enantiosseletiva em pacientes hipertensos com função renal normal e em pacientes hipertensos com insuficiência renal crônica, com observação de maiores concentrações plasmáticas (AUC^{0-24}) e *clearance* de formação (Cl_M) para o (R)-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico.

INFLUÊNCIA DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA NO METABOLISMO ESTEREOSSELETIVO DO METOPROLOL

- ✎ A formação do α -hidroximetoprolol é favorecida e o *clearance* renal (Cl_R) dos quatro isômeros é reduzido nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica.
- ✎ A formação do ácido O-desmetilmetoprolóico é favorecida e o *clearance* renal (Cl_R) dos dois enantiômeros é reduzido nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica.

FARMACODINÂMICA DO METOPROLOL

A avaliação dos parâmetros farmacodinâmicos obtidos no final de cada semana de tratamento com placebo ou doses crescentes de metoprolol em regime de doses múltiplas *p.o.* e um período de *wash-out* permitiu inferir as seguintes conclusões:

- ✎ Não há relação entre a administração de metoprolol e a concentração de noradrenalina plasmática para os pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica.
 - ✎ Não há relação entre a administração de metoprolol e a pressão arterial sistólica e diastólica para os pacientes hipertensos portadores ou não de insuficiência renal crônica.
 - ✎ A frequência cardíaca é reduzida após administração de 200 mg de tartarato de metoprolol e o pico do efeito coincide com o pico de concentração plasmática do eutômero (S)-(-)-metoprolol.
 - ✎ As concentrações plasmáticas de noradrenalina, a pressão arterial sistólica e diastólica e a frequência cardíaca não sofreram alterações em decorrência da insuficiência renal crônica.
-

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução RE nº 478 de 19 de março de 2002. **Diário Oficial**, 20 de março de 2002.
2. AKLILLU, E. PERSSON, I. BERTILSSON, L. JOHANSSON, I., RODRIGUES, F. ILGELMAN-SUNDBERG, M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 441-46, 1996.
3. BALMÉR, K.; PERSSON, A.; LAGERSTRÖM, P.O.; PERSSON, B.A.; SCHILL, G. Liquid chromatographic separation of the enantiomers of metoprolol and its α -hydroxy metabolite on Chiralcel OD for determination in plasma and urine. **J. Chromatogr.**, v. 553, p. 391-7, 1991.
4. BASCI, N.E.; BOZKURT, A.; ISIMER, A.; KAYAALP, S.O. Correlation between the metabolic ratios of debrisoquine and metoprolol in Turkish subjects. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 75, p. 62-4, 1994.
5. BERNAREGGI, A. Farmacocinetica di principi attivi chirali. **Boll. Chim. Farm.**, Milano, v. 134, p.63-8, 1995.
6. BERTILSSON, L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 29(3), p. 192-209, 1985.
7. BORG, K.O.; CARLSSON, E.; HOFFMANN, K.J.; JOHANSSON, T.E.; THORIN, H.; WALLIN, B. Metabolism of metoprolol-(H³) in man, the dog and the rat. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 36 (Supl V), p. 125-35, 1975.
8. CERQUEIRA, P.M. Enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol em pacientes hipertensos fenotipados como metabolizadores rápidos da debrisoquina. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 1999.
9. CERQUEIRA, P.M.; CESARINO, E.J.; MATEUS, F.H.; MERE Jr., Y.; SANTOS, S.R.C.J.; LANCHOTE, V.L. Enantioselectivity in the steady-state pharmacokinetics of metoprolol in hypertensive patients. **Chirality**, v. 11, p. 591-97, 1999.
10. CERQUEIRA, P.M.; MATEUS, F.H.; CESARINO, E.J.; LANCHOTE, V.L. Enantioselectivity of debrisoquine 4-hydroxylation in Brazilian Caucasian hypertensive patients phenotyped as extensive metabolizers. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.**, v. 749, p. 153-61, 2000.
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. **J. Chromatogr. B**, v. 783, p. 433-441, 2003.
12. CERQUEIRA, P.M.; CESARINO, E.J.; BERTUCCI, C.; BONATO, P.S.; LANCHOTE, V.L. Stereosselective metabolism of metoprolol: enantioselectivity of α -hydroxymetoprolol in plasma and urine. **Chirality**, v. 15(6), p. 542-9, 2003.
 13. CHIU, F.C.K.; DAMANI, L.A.; LI, R.C.; TOMLINSON, B. Efficient high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of metoprolol and two main metabolites in human urine by solid-phase extraction and fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v. 696, p. 69-74, 1997.
 14. CHING, M. S.; LENNARD, M. S.; GREGORY, A.; TUCKER, G. T. Measurement of underivatized metoprolol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography with chiral stationary phase. **J. Chromatogr.**, v. 497, p. 313-18, 1989
 15. COHEN, E.P.; LEMANN, J.Jr. The role of the laboratory in evaluation of kidney function. **Clin. Chem.**, v. 37 (6), p. 785-96, 1991.
 16. DAHL, M.-L.; JOHANSSON, I.; BERTLSSON, L. et al. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p.516-20, 1995.
 17. EBIHARA, A. & FUJIMURA, A. Metabolites of antihypertensive drugs. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 21, p. 331-43, 1991.
 18. FOSTER, C.D. & MACDONALD, I.A. The assay of the catecholamine content of small volumes of human plasma. **Biom. Chromatogr.**, v. 13, p. 209-15, 1999.
 19. GODBILLON, J. & DUVAL, M. Determination of two metoprolol metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography, **J. Chromatog.**, v. 309, p. 198-202, 1984.
 20. GRANVIL, C.P.; KRAUSZ, K.W.; GELBOIN, H.V.; IDLE, J.R.; GONZALEZ, F.J. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 301, p. 1025-32, 2002.
 21. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
 22. HEIN, M.H. & MEYER, U.A. Genetic polymorphism of debrisoquine oxidation: restriction fragment analysis and allele-specific amplification of mutant alleles of CYP2D6. **Meth. Enzym.**, v. 206, p. 173-83, 1991.

23. HENRICH, W.L.; MITCHELL, H.; ANDERSON, S.; CRONIN, R.; PETTINGER, W.A. Effect of antihypertensive therapy on plasma catecholamines in renal failure patients. **Clin. Nephrol.**, v. 16(3), p. 131-6, 1981.
24. HERRING, V.L.; BASTIAN, T.L.; LALONDE, R.L. Solid-phase extraction and direct high- performance liquid chromatographic determination of metoprolol enantiomers in plasma. **J. Chromatogr.**, v. 567, p. 221-7, 1991.
25. HOFFMANN, K.-J.; REGARDH, C.G.; AURELL, M.; ERVIK, M.; JORDÖ, L. The effect of impaired renal function on the plasma concentration and urinary excretion of metoprolol metabolites. **Clin. Pharmacok.**, v. 5, p. 181-91, 1980.
26. HOLLENBACH, E.; SCHULZ, C.; LEHNERT, H. Rapid and sensitive determination of catecholamines and the metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphen-ethyleneglycol using HPLC following novel extraction procedures. **Life Sciences**, v. 63, n. 9, p. 737-50, 1998.
27. HUANG, J.; CHUANG, S.K.; CHENG, C.L.; LAI, M.L. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP2D6 genotypes. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.65, p. 402-7, 1999.
28. JAMALI, F.; MEHVAR, R.; PASUTTO, F.M. Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls. **J. Pharm. Sci.**, v. 78, p. 695-715, 1989.
29. JOHANSSON, I.; LUNDQVIST, E.; BERTILSSON, L.; DAHL, M.-L.; SJÖQVIST, F.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 11825-29, 1993.
30. JOHNSON, J.A. & BURLEW, B.S. Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. **Drug. Metabol. Dispos.**, v. 24 (3), p. 350-5, 1996.
31. JONKERS, R.E.; KOOPMANS, R.P.; PORTIER, E.J.G.; BOXTEL, C.J.van. Debrisoquine phenotype and the pharmacokinetics and Beta-2 receptor pharmacodynamics of metoprolol and its enantiomers. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 256 (3), p. 959-66, 1991.
32. JUNG, S.-H.; LINH, P.T.; LIM, H.-K.; KIM, H.-J.; KIM, K.H.; KANG, J.-S. Enantioselective preparation of metoprolol and its major metabolites. **Arch Pharm. Res.**, v. 23(2), p. 226-9, 2000.
33. KAISARY, A.; SMITH, P.; JACZQ, E.; McALLISTER, C.B.; WILKINSON, G.R.; RAY, W.A.; BRANCH, R.A. Genetic predisposition

- to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors. **Cancer Res.**, v. 47 (20), p. 5488-93, 1987.
34. KIM, K.H.; SHIN, S.D.; LEE, J. H.; LEE, S.C.; KANG, J.-S.; MAR, W.; HONG, S.-P.; KIM, H.-J. Chiral separation of the enantiomers of metoprolol and its metabolites by high performance liquid chromatography. **Arch Pharm. Res.**, v. 23 (2), p. 230-6, 2000.
 35. LANCHOTE, V.L.; PING, W.C.; SANTOS, S.R.C.J. Influence of renal failure on cytochrome P450 activity in hypertensive patients using a "cocktail" of antipyrine and nifedipine. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 50, p. 83-9, 1996.
 36. LANCHOTE, V.L.; BONATO, P.S.; CERQUEIRA, P.M.; PEREIRA, V.A.; CESARINO, E.J. Enantioselective analysis of metoprolol in plasma using high-performance liquid chromatographic direct and indirect separations: applications in pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, v. 738, p. 27-37, 2000.
 37. LEEMANN, T.D.; DEVI, K.P.; DAYER, P. Similar effect of oxidation deficiency (debrisoquine polymorphism) and quinidine on the apparent volume of distribution of ($\pm$)-metoprolol. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, p. 65-71, 1993.
 38. LENNARD, M.S.; SILAS, J.H.; FREESTONE, S.; RAMSAY, L.E.; TUCKER, G.T.; WOODS, H.F. Oxidation phenotype- a major determinant of metoprolol metabolism and response. **New Eng. J. Med.**, v. 133, p. 161-6, 1977.
 39. LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; SILAS, J.H.; FREESTONE, S.; RAMSAY, L.E.; WOODS, H.F. Differential stereoselective metabolism of metoprolol in extensive and poor debrisoquine metabolizers. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 34, p. 732-7, 1983.
 40. LENNARD, M.S. Quantitative analysis of metoprolol and three of its metabolites in urine and liver microsomes by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 342, p. 199-205, 1985
 41. LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; WOODS, H.E.; SILAS, J.H.; IYUN, A.O. Stereoselective metabolism of metoprolol in caucasians and nigerians - relationship to debrisoquine oxidation phenotype. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 27, p. 613-6, 1989.
 42. LI, F.; COOPER, S.F.; CÔTÉ, M. Determination of the enantiomers of metoprolol and its major acidic metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B**, v. 668, p. 67-75, 1995.
 43. LIM, H.K.; LINH, P.T.; HONG, C.-H.; KIM, K.-H.; KANG, J.-S. Enantioselective determination of metoprolol and major metabolites in

- human urine by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B.**, v. 755, p. 259-64, 2001.
44. LLERANA, A.; COBALEDA, J.; MARTÍNEZ, C.; BENÍTEZ, J. Interethnic differences in drug metabolism: influence of genetic and environmental factors on debrisoquine hydroxylation phenotype. **Eur J Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 21, p. 129-38, 1996.
 45. LLOYD, P.; JOHN, V.A.; SIGNY, M.; SMITH, S.E. The effect of impaired renal function on the pharmacokinetics of metoprolol after single administration of a 14/190 metoprolol OROS system. **Am. Heart. J.**, v. 120, p. 478-82, 1990.
 46. MADANI, S.; PAINE, M.F.; LEWIS, L.; THUMMEL, K.E.; SHEN, D.D. Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. **Pharmac. Res.**, v. 16(8), p. 1199-1205, 1999.
 47. MAUTZ, D.S.; NELSON, W.L.; SHEN, D.D. Regioselective and stereoselective oxidation of metoprolol and bufuralol catalyzed by microsomes containing cDNA-expressed human P4502D6. **Drug Metab. Disp.**, v. 23, p. 513-7, 1995.
 48. MEIER, A.; WEIDMANN, P.; ZIEGLER, W.H. Responses of catecholamines and blood pressure to beta-blockade in diuretic-treated patients with essential-hypertension. **Klin. Wochenschr.**, v. 60, p. 27-32, 1982.
 49. MISTRY, B.; LESLIE, J.; EDDINGTON, N.E. A sensitive assay of metoprolol and its major metabolite α -hydroxy metoprolol in human plasma and determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in urine with high performance liquid chromatography and fluorometric detection. **J. Pharmac. Biom. An.**, v. 16, p. 1041-9, 1998.
 50. MISTRY, B.; LESLIE, J.; EDDINGTON, N.E. Enantiomeric separation of metoprolol and α -hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. **J. Chromatogr. B.**, v. 758, p. 153-61, 2001.
 51. MISTRY, B.; LESLIE, J.; EDDINGTON, N.E. 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.
 52. MURTHY, S.S.; SHETTY, H.U.; NELSON, W.L.; JACKSON, P.R.; LENNARD, M. S. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40 (7), p. 1637-44, 1990.

53. NATION, R.L. Chirality in new drug development. Clinical pharmacokinetic considerations. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 27, p.249-55, 1994.
 54. OTTON, S.V.; CREWE, H.K.; LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; WOODS, H.F. Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.247 (1), 1988.
 55. PAAP, C.M.; NAHATA, M.C. The relation between type of renal disease and renal drug clearance in children. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 44 (2), p. 195-7, 1993.
 56. PERRONE, R.D.; MADIAS, N.E.; LEVEY, A.S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. **Clin. Chem.**, v. 38 (10), p.1933-53, 1992.
 57. REGARDH, C.-G.; BORG, K.O.; JOHANSSON, R.; JOHANSSON G.; PALMER, L. Pharmacokinetics studies on the selective β_1 -receptor antagonist metoprolol in man. **J. Pharmacokinet. Biopharm.**, v. 2, p. 347-64, 1974.
 58. RODEN, D.M. Mirror, mirror on the wall...Stereochemistry in therapeutics. **Circulation**, v. 89, p. 2451-3, 1994.
 59. REIDENBERG, M.M. The biotransformation of drugs in renal failure. **Am. J. Med.**, v. 62, p. 482-5, 1977.
 60. ROSTAMI-HODJEGAN A.; FUNCK-BRENTANO, C.; KROEMER, H.K.; TUCKER, G.T. *In vivo* indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 47, p. 575P-602P, 1999.
 61. SANTOSTASI, G.; FRACCAROLLO,D.; DORIGO,P.; EGLOFF, C. MIRAGLIA, G.; MARINATO, P.G.; VILANOVA, C.; FASOLI, G.; MARAGNO, I. Early reduction in plasma norepinephrine during beta-blocking therapy with metoprolol in chronic heart failure. **J. Card. Fail.**, v. 4(3), p. 117-84, 1998.
 62. SCHAAF, L.J.; CAMPBELL, S.C.; MAYERSOHN, M.B.; VAGEDES, T.; PERRIER, D.G. Influence of smoking and gender on the disposition kinetics of metoprolol. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 33, p. 355-61, 1987.
 63. SCHUSTER, D.; MODI, M.W.; LALKA, D.; GENGO, F. M. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay to quantitate diastereomeric derivatives of metoprolol in plasma. **J. Chromatog.**, v. 433, p. 318-25, 1988.
 64. SHARGEL, L. & YU; A.B.C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. London: Prentice Hall International, 1993. 625p.
-

65. SHETTY, H.U. & NELSON, W.L. Chemical aspects of metoprolol metabolism. Asymmetric synthesis and absolute configuration of the 3-[4-(1-hydroxy-2-methoxyethyl)phenoxy]-1-(isopropylamino)-2-propanols, the diastereomeric benzylic hydroxylation metabolites. **J. Med. Chem.**, v. 31, p.55-59, 1988.
66. SOHN, D.R.; KUSAKA, M.; SHIN, S.G.; JANG, I-j; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T. Utility of a one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian populations. **Ther. Drug Monit.**, v. 14, p. 184-9, 1992.
67. TUCKER, G.T.; SILAS, J.H.; IYUN, A.O.; LENNARD, M.S.; SMITH, A.J. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine. **Lancet**, v. 2, p. 718, 1977.
68. TUCKER, G.T. Advances in understanding drug metabolism and its contribution to variability in patients response. **Ther. Drug Monit.**, v. 22 (1), p.110-3, 2000.
69. TUCKER, G.T. Chiral switches. **The Lancet**, v. 355, p. 1085-7, 2000.
70. TURNHEIM, K. Pitfalls of pharmacokinetic dosage guidelines in renal insufficiency. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.40, p. 87-93, 1991.
71. WALLF, T.; WEBB, J.G.; BAGWELL, E.E.; WALLE, U.K.; DANIEL, H.B.; GAFFNEY, T.E. Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists. **Biochem. Pharmacol.**, v.37, p.115-24, 1988.
72. WAN, J.; XIE, Y.H.; LU, Y.Q. Age might influence the frequency distribution of metoprolol hydroxylation polymorphism in a Chinese population. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 80, p. 167-170, 1997.

SUMMARY

CERQUEIRA, P.M. Stereoselectivity in metoprolol metabolism in hypertensive patients with and without chronic renal failure. 2003.

In the present study we investigated the influence of chronic renal failure (CRF) in the stereoselective metabolism of metoprolol administered in the racemic form in a *p.o.* multiple-dose regimen. The study was conducted on 15 patients of both sexes with essential hypertension, divided into two groups according to their creatinine clearances. The patients were phenotyped using debrisoquine as probe drug (CYP2D6) according to the urine ratios debrisoquine to 4-hydroxydebrisoquine. The patients were treated with placebo, 50, 100 and 200 mg of metoprolol tartrate (Seloken[®], Astra, Brazil) every 24 h for 7 days each treatment. A blood sample was collected and the ambulatory blood pressure was monitored in the end of each week. Serial blood samples and urine were collected during 36 h after seven days of 200 mg metoprolol administration. The plasma and urine concentrations of metoprolol and α -hydroxymetoprolol (Chiralpak[®] AD column) and metoprolol acidic metabolite isomers (Chiralcel[®] OD-R column) were determined by HPLC using fluorescence detection (λ_{exc} = 229 nm; λ_{em} = 298 nm). Plasmatic noradrenaline concentrations and systolic and diastolic blood pressure did not change in the different treatment phases. Heart beat was reduced in both groups after 200 mg metoprolol administration: Pharmacokinetic parameters were statistically different between (S)-(-)- and (R)-(+)-metoprolol in the control and chronic renal failure groups for the patients phenotyped as debrisoquine extensive metabolizers, resulting in the plasmatic accumulation of the eutomer (S)-(-)-. The formation of the new chiral centre 1'R- α -hydroxymetoprolol was favoured for both metoprolol enantiomers, resulting in ratios 1'R/1'S $\cong$ 2.5 in both groups. The formation of (R)-(+)-metoprolol acidic metabolite was favoured in both groups, supporting the plasmatic accumulation of (S)-(-)-metoprolol. Comparing the pharmacokinetics parameters between the control and CRF groups (Mann-Whitney test), we can observe that metoprolol pharmacokinetics was not altered despite the plasmatic accumulation of all the α -hydroxymetoprolol and metoprolol acidic metabolite isomers. The two patients phenotyped as debrisoquine poor metabolizers did not form α -hydroxymetoprolol and the formation of (S)-(-)- metoprolol acidic metabolite was favoured, resulting in the plasmatic accumulation of (R)-(+)-metoprolol. The differences observed between the Control and CRF groups suggest that the chronic renal failure

does not induce CYP2D6 but induces the activity of the other enzymatic system responsible for the formation of metoprolol acidic metabolite.

Key-words: metoprolol, chronic renal failure, hypertension, patients, pharmacokinetics, enantiomers, CYP2D6.

APÊNDICE 1

CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

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

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 02 de março de 1999

Ofício nº 405/99
CEP/SPC

Senhor Professor:

O trabalho intitulado "ENANTIOSSELETIVIDADE NO METABOLISMO OXIDATIVO DO METOPROLOL EM PACIENTES HIPERTENSOS PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA COM FENÓTIPO DE METABOLIZADORES EXTENSIVOS DO CYP2D6", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 55ª Reunião Ordinária realizada em 01/03/99, e enquadrado na categoria: APROVADO, de acordo com o Processo HCRP nº 7366/98.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF.DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
Prof.Dr. EDUARDO BARBOSA COELHO
Depto. de Clínica Médica
Em mãos

APÊNDICE 2

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Campus Universitário Monte Alegre – RIBEIRÃO PRETO – SP

PESQUISA CIENTÍFICA
TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

NOME DO PACIENTE / IDADE:...../.....

REGISTRO E/OU DOCUMENTO DE
IDENTIFICAÇÃO.....

NOME DA PESQUISA: "ENANTIOSSELETIVIDADE NO METABOLISMO
OXIDATIVO DO METOPROLOL EM PACIENTES HIPERTENSOS
PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA COM FENÓTIPO
DE METABOLIZADORES EXTENSIVOS DO CYP2D6"

RESPONSÁVEL CLÍNICO E COORDENADOR DO PROJETO: Prof. Dr.
Eduardo Barbosa Coelho (FMRP-USP) – CREMESP 68.329

OBSERVAÇÕES: Projeto Integrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP,
Centro Avançado de Estudos em Farmacologia Clínica e Terapêutica:
Unidade I Laboratório de Pesquisa -INCOR HC FMUSP e Unidade
II - Laboratório-Escola –Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

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

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

“Essa pesquisa procura entender alguns motivos pelos quais os remédios utilizados para abaixar a pressão arterial não funcionam ou produzem efeitos não desejados. Para responder a estas dúvidas, desejamos saber como o metoprolol, que você vai tomar para controlar a sua pressão arterial, é eliminado pelo seu corpo. Esta pesquisa terá a duração de 1 mês e no final de cada semana nós vamos precisar fazer alguns exames de sangue para dosar o remédio, além de colocar um aparelho automático para medir a pressão arterial a cada 15 minutos, em sua casa, por 24 horas. No final da última semana você será internado por 24 horas no Hospital das Clínicas. Neste dia amostras de 5 ml de sangue serão colhidas várias vezes com seringa da veia do seu braço, assim como amostras de urina. Pode acontecer de aparecerem efeitos não desejados como cansaço, fraqueza ou falta de ar. Caso isto ocorra nós substituiremos os remédios. Pode acontecer que a sua pressão arterial não abaixe além de 180 x 110 mmHg. Neste caso nós trocaremos os remédios. A sua colaboração vai aumentar o nosso conhecimento de como os remédios para abaixar a pressão são eliminados pelo corpo e poderá ajudar na escolha e no ajuste da dosagem para o Sr/Sra. e para outras pessoas com problemas de saúde semelhantes ao seu.”

- 2- Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso leve a que eu deixe de ser tratado como os demais pacientes na Instituição.

- 3- Meu consentimento aplica-se, igualmente, a participar da pesquisa como componente de grupo-controle, podendo receber substâncias inócuas ou inativas, com a finalidade de dimensionar o "efeito-placebo" cuja natureza, sendo o caso, me foi explicada pelo médico.

- 4- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como paciente.

APÊNDICE 3

L.S.S. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	44,7
Creatinina (mg/dL)	1,6
Glicose (mg/dL)	99,7
Na (mEq/L)	148
K (mEq/L)	3,9
Ca (mg/dL)	10,2
Ácido Úrico (mg/dL)	14,4
Colesterol (mg/dL)	176
HDL (mg/dL)	42,9
LDL (mg/dL)	110
Triglicéride (mg/dL)	112
TGO (mg/dL)	32
TGP (mg/dL)	25
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	0,64

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,33
Hemoglobina (g/100mL)	14,3
Hematócrito (%)	38,6
VCM (fi)	89,1
HCM (pg)	33,1
CHCM (g/dL)	37,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,0
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	61,2
Eosinófilos (%)	3,6
Basófilos (%)	0,5
Linfócitos (%)	24,4
Monócitos (%)	10,3
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	201

Uroanálise

pH	5,5
Densidade (g/L)	1,015
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausente
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	2 a 3
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
48,0

B.M.S. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	137,5
Creatinina (mg/dL)	2,3
Glicose (mg/dL)	92,4
Na (mEq/L)	144
K (mEq/L)	4,6
Ca (mg/dL)	9,8
Ácido Úrico (mg/dL)	11,5
Colesterol (mg/dL)	160
HDL (mg/dL)	25
LDL (mg/dL)	101
Triglicéride (mg/dL)	166
TGO (mg/dL)	29
TGP (mg/dL)	15
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	0,91

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	3,59
Hemoglobina (g/100mL)	10,9
Hematócrito (%)	31,7
VCM (fi)	88,2
HCM (pg)	30,5
CHCM (g/dL)	34,6
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,5
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	62,5
Eosinófilos (%)	9,2
Basófilos (%)	1,1
Linfócitos (%)	21,3
Monócitos (%)	5,9
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	159

Uroanálise

pH	5,0
Densidade (g/L)	1,015
Proteínas	(+)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausente
Leucócitos (/campo)	3 a 4
Hemácias (/campo)	1 a 2
Cilindros	Hialinos
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
51,5

M.D.S.M. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	53,2
Creatinina (mg/dL)	1,5
Glicose (mg/dL)	95,3
Na (mEq/L)	140
K (mEq/L)	3,5
Ca (mg/dL)	10,6
Ácido Úrico (mg/dL)	7,0
Colesterol (mg/dL)	201
HDL (mg/dL)	48,8
LDL (mg/dL)	123
Triglicéride (mg/dL)	144
TGO (mg/dL)	
TGP (mg/dL)	
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	

Exames Hematológicos

Uroanálise

pH	6,0
Densidade (g/L)	1,010
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	2 a 3
Hemácias (/campo)	Ausentes
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl _{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
51,0

A.L.R. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	6,6
Creatinina (mg/dL)	2,6
Glicose (mg/dL)	67,0
Na (mEq/L)	146
K (mEq/L)	4,5
Ca (mg/dL)	8,9
Ácido Úrico (mg/dL)	7,7
Colesterol (mg/dL)	152
HDL (mg/dL)	42,8
LDL (mg/dL)	77
Triglicéride (mg/dL)	159
TGO (mg/dL)	34
TGP (mg/dL)	88
δ-GT (mg/dL)	57
Bilirrubina Total (U/L)	0,69

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,69
Hemoglobina (g/100mL)	15,4
Hematócrito (%)	45,2
VCM (fl)	96,4
HCM (pg)	32,9
CHCM (g/dL)	34,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,2
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	70,6
Eosinófilos (%)	1,8
Basófilos (%)	0,1
Linfócitos (%)	19,8
Monócitos (%)	7,7
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	103

Uroanálise

pH	6,0
Densidade (g/L)	1,011
Proteínas	(+)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	3 a 4
Hemácias (/campo)	3 a 4
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina Endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
25,8

J.C.G. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	62,7
Creatinina (mg/dL)	2,3
Glicose (mg/dL)	118
Na (mEq/L)	149
K (mEq/L)	4,7
Ca (mg/dL)	9,4
Ácido Úrico (mg/dL)	8,8
Colesterol (mg/dL)	143
HDL (mg/dL)	32
LDL (mg/dL)	96
Triglicéride (mg/dL)	94
TGO	30,2
TGP	
δ-GT	28,1
Bilirrubina (Total)	0,76

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,81
Hemoglobina (g/100mL)	15,7
Hematócrito (%)	43
VCM (fi)	89
HCM (pg)	32,6
CHCM (g/dL)	36,5
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	10,4
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	55,4
Eosinófilos (%)	9,8
Basófilos (%)	0,5
Linfócitos (%)	27,7
Monócitos (%)	6,6
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	310

Uroanálise

pH	7,0
Densidade (g/L)	1,013
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	Indício
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Várias
Cristais	Ausente
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	3 a 4
Cilindros	Ausente
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
59,8

I.L.S. (IRC)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	56,7
Creatinina (mg/dL)	1,6
Glicose (mg/dL)	94,5
Na (mEq/L)	144
K (mEq/L)	3,5
Ca (mg/dL)	8,9
Ácido Úrico (mg/dL)	5,0
Colesterol (mg/dL)	207
HDL (mg/dL)	55
LDL (mg/dL)	129
Triglicéride (mg/dL)	112
TGO	22,8
TGP	17,4
δ-GT	8,9
Bilirrubina	

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	3,98
Hemoglobina (g/100mL)	11,6
Hematócrito (%)	35,0
VCM (fl)	87,9
HCM (pg)	29,3
CHCM (g/dL)	33,3
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3900
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	
Eosinófilos (%)	
Basófilos (%)	
Linfócitos (%)	
Monócitos (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	213

Uroanálise

pH	7,0
Densidade (g/L)	1,015
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(+)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Ausente
Cristais	
Leucócitos (/campo)	(-)
Hemácias (/campo)	
Cilindros	
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina Endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
37,4

J.L.C. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	3,6
Creatinina (mg/dL)	0,9
Glicose (mg/dL)	96
Na (mEq/L)	145
K (mEq/L)	4,2
Ca (mg/dL)	
Ácido Úrico (mg/dL)	5,2
Colesterol (mg/dL)	210
HDL (mg/dL)	46,4
LDL (mg/dL)	136
Triglicéride (mg/dL)	137
TGO	25
TGP	50
δ-GT	31
Bilirrubina	1,06

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,8
Hemoglobina (g/100mL)	15,6
Hematócrito (%)	45,2
VCM (fi)	94,1
HCM (pg)	32,5
CHCM (g/dL)	34,5
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	4,8
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	64,5
Eosinófilos (%)	1,8
Basófilos (%)	0,1
Linfócitos (%)	25,7
Monócitos (%)	7,9
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	220

Uroanálise

pH	6,0
Densidade (g/L)	1,022
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Oxalato de Ca
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	1 a 2
Cilindros	Ausente
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina . endógena

Cl_{Cr} (mL/min.1,73m ²)
82,0

M.J.J.C. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	19,9
Creatinina (mg/dL)	0,8
Glicose (mg/dL)	122,8
Na (mEq/L)	142
K (mEq/L)	3,8
Ca (mg/dL)	9,6
Ácido Úrico (mg/dL)	7,4
Colesterol (mg/dL)	145
HDL (mg/dL)	43
LDL (mg/dL)	74
Triglicéride (mg/dL)	136
TGO (mg/dL)	18,5
TGP (mg/dL)	16
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	0,45

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,24
Hemoglobina (g/100mL)	7,8
Hematócrito (%)	24,4
VCM (fi)	57,4
HCM (pg)	18,5
CHCM (g/dL)	32,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,1
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	64,2
Eosinófilos (%)	4,0
Basófilos (%)	0,7
Linfócitos (%)	23,8
Monócitos (%)	7,3
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	265

Uroanálise

pH	
Densidade (g/L)	
Proteínas	
Glicose (mg/dL)	
Cetonas	
Pigmentos Biliares	
Sangue Oculto	
Urobilirubina	
Células Epiteliais	
Muco	
Cristais	
Leucócitos (/campo)	
Hemácias (/campo)	
Cilindros	
Nitritos	
Bilirrubina	

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
123,4

L.A.M. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	42,6
Creatinina (mg/dL)	1,0
Glicose (mg/dL)	98,7
Na (mEq/L)	143
K (mEq/L)	4,1
Ca (mg/dL)	9,2
Ácido Úrico (mg/dL)	6,2
Colesterol (mg/dL)	
HDL (mg/dL)	
LDL (mg/dL)	
Triglicéride (mg/dL)	
TGO (mg/dL)	21,4
TGP (mg/dL)	30,1
δ-GT (mg/dL)	39,2
Bilirrubina Total (U/L)	0,21

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,87
Hemoglobina (g/100mL)	15,1
Hematócrito (%)	42,7
VCM (fi)	87,5
HCM (pg)	31
CHCM (g/dL)	35,4
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,0
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	67
Eosinófilos (%)	
Basófilos (%)	1,0
Linfócitos (%)	28
Monócitos (%)	4,0
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	216

Uroanálise

pH	5,5
Densidade (g/L)	1,029
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	2 a 3
Hemácias (/campo)	Ausentes
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m ²)
90,0

C.S.B. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	21,0
Creatinina (mg/dL)	0,8
Glicose (mg/dL)	123,4
Na (mEq/L)	144
K (mEq/L)	4,3
Ca (mg/dL)	
Ácido Úrico (mg/dL)	5,4
Colesterol (mg/dL)	237
HDL (mg/dL)	49,9
LDL (mg/dL)	164
Triglicéride (mg/dL)	115
TGO (mg/dL)	
TGP (mg/dL)	
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,69
Hemoglobina (g/100mL)	14,4
Hematócrito (%)	40,4
VCM (fi)	86,0
HCM (pg)	30,6
CHCM (g/dL)	35,6
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,3
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	47,5
Eosinófilos (%)	3,4
Basófilos (%)	0,6
Linfócitos (%)	40,9
Monócitos (%)	7,6
Plaquetas mm^3	219

Uroanálise

pH	6,5
Densidade (g/L)	1,008
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	várias
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	Ausentes
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73 m^2)
87,0

W.G.B. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	42,2
Creatinina (mg/dL)	1,0
Glicose (mg/dL)	118,4
Na (mEq/L)	137
K (mEq/L)	4,4
Ca (mg/dL)	
Ácido Úrico (mg/dL)	9,6
Colesterol (mg/dL)	206
HDL (mg/dL)	52
LDL (mg/dL)	111
Triglicéride (mg/dL)	212
TGO (mg/dL)	
TGP (mg/dL)	
δ-GT (mg/dL)	
Bilirrubina Total (U/L)	0,69

Uroanálise

pH	6,5
Densidade (g/L)	1,020
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	Ausentes
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl _{Cr} (mL/min/1,73m ²)
124,9

M.A.S.D. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	36,8
Creatinina (mg/dL)	1,0
Glicose (mg/dL)	103,2
Na (mEq/L)	140
K (mEq/L)	3,3
Ca (mg/dL)	10,4
Ácido Úrico (mg/dL)	6,1
Colesterol (mg/dL)	290
HDL (mg/dL)	50,5
LDL (mg/dL)	189
Triglicéride (mg/dL)	249
TGO (mg/dL)	30,1
TGP (mg/dL)	31,2
δ-GT (mg/dL)	30,2
Bilirrubina Total (U/L)	0,83

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,62
Hemoglobina (g/100mL)	14,2
Hematócrito (%)	39,9
VCM (fl)	86,4
HCM (pg)	30,8
CHCM (g/dL)	35,6
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,3
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	65,5
Eosinófilos (%)	2,5
Basófilos (%)	0,6
Linfócitos (%)	21,7
Monócitos (%)	9,7
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	223

Uroanálise

pH	5,5
Densidade (g/L)	1,027
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	1,0
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Hialinos
Leucócitos (/campo)	6 a 8
Hemácias (/campo)	1 a 2
Cilindros	Oxalato de Ca
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(+)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73m ²)
71,2

C.A.S. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	24,7
Creatinina (mg/dL)	1,1
Glicose (mg/dL)	92,8
Na (mEq/L)	140
K (mEq/L)	4,1
Ca (mg/dL)	9,9
Ácido Úrico (mg/dL)	7,7
Colesterol (mg/dL)	179
HDL (mg/dL)	45
LDL (mg/dL)	118
Triglicéride (mg/dL)	79
TGO (mg/dL)	19,2
TGP (mg/dL)	30,6
δ-GT (mg/dL)	49,6
Bilirrubina Total (U/L)	0,78

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,58
Hemoglobina (g/100mL)	14,3
Hematócrito (%)	43,1
VCM (fi)	94,2
HCM (pg)	31,3
CHCM (g/dL)	33,2
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	5,4
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	
Eosinófilos (%)	
Basófilos (%)	
Linfócitos (%)	37,3
Monócitos (%)	
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	241

Uroanálise

pH	5,5
Densidade (g/L)	1,030
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Raras
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	1 a 2
Hemácias (/campo)	Ausentes
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina Endógena

Cl _{Cr} (mL/min/1,73m ²)
112,1

E.L.S. (Controle)

Bioquímica do Sangue

Uréia (mg/dL)	22,9
Creatinina (mg/dL)	1,2
Glicose (mg/dL)	114,8
Na (mEq/L)	143
K (mEq/L)	4,5
Ca (mg/dL)	8,8
Ácido Úrico (mg/dL)	8,0
Colesterol (mg/dL)	226
HDL (mg/dL)	56
LDL (mg/dL)	131
Triglicéride (mg/dL)	195
TGO (mg/dL)	26
TGP (mg/dL)	46,2
δ-GT (mg/dL)	75,7
Bilirrubina Total (U/L)	0,67

Exames Hematológicos

Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	5,05
Hemoglobina (g/100mL)	14,5
Hematócrito (%)	43,7
VCM (fi)	86,4
HCM (pg)	28,6
CHCM (g/dL)	33,1
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,4
Bastonetes (%)	
Segmentados (%)	60,7
Eosinófilos (%)	2,6
Basófilos (%)	0,8
Linfócitos (%)	28,3
Monócitos (%)	7,6
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	254

Uroanálise

pH	7,0
Densidade (g/L)	1,010
Proteínas	(-)
Glicose (mg/dL)	(-)
Cetonas	(-)
Sangue Oculto	(-)
Urobilirubina	0,2
Células Epiteliais	Várias
Cristais	Ausentes
Leucócitos (/campo)	2 a 3
Hemácias (/campo)	1 a 2
Cilindros	Ausentes
Nitritos	(-)
Bilirrubina	(-)

Clearance da creatinina endógena

Cl_{Cr} (mL/min/1,73m ²)
78,5

APÊNDICE 4

TABELA i - Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em plasma

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
$C_{\max}$ (ng/mL)	86,03	60,53	113,55	90,78	46,62	105,41	105,85
	98,42	80,01	126,83	101,57	52,67	121,66	121,51
$t_{\max}$ (h)	2,0	1,0	1,0	4,0	1,5	1,0	1,5
	1,5	1,0	1,0	4,0	2,0	1,0	1,5
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	599,3	327,2	716,1	1247,14	426,7	733,8	636,7
	694,4	430,2	927,1	1435,7	460,4	903,0	774,61
Vd/f (L/kg)	20,2	97,1	25,7	8,6	36,4	14,9	9,6
	25,8	49,1	18,5	7,9	31,5	13,4	8,8
Cl_T/f (L/h/kg)	1,63	2,57	1,14	0,86	2,00	0,99	1,53
	1,41	1,95	0,88	0,75	1,85	0,81	1,26
$t_{1/2\beta}$ (h)	8,6	26,2	15,6	7,0	12,6	10,4	4,3
	12,7	17,4	14,5	7,3	11,8	11,5	4,8
β (h ⁻¹)	0,0806	0,0264	0,0444	0,0990	0,0548	0,0666	0,1593
	0,0546	0,0398	0,0478	0,0949	0,0587	0,0603	0,1429
$AUC^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	1,16	1,31	1,29	1,15	1,08	1,23	1,22

Linhas sem sombras = (R)-(+)-metoprolol; linhas sombreadas = (S)-(-)-metoprolol

TABELA ii - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em plasma

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
$C_{\max}$ (ng/mL)	133,05	177,43	54,57	147,20	74,84	99,15
	168,31	213,95	71,95	172,15	94,43	91,00
$t_{\max}$ (h)	1,5	0,5	3,0	6,0	1,0	1,0
	1,5	0,5	3,0	6,0	1,0	1,0
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	556,7	576,9	429,4	1464,1	322,1	559,5
	686,5	764,3	568,5	1776,3	416,2	603,6
Vd/f (L/kg)	19,7	17,5	28,1	6,1	27,4	12,6
	10,3	9,7	23,9	5,9	34,0	12,5
Cl_T/f (L/h/kg)	1,75	1,62	2,31	0,67	2,38	1,41
	1,42	1,22	1,74	0,56	1,84	1,31
$t_{1/2\beta}$ (h)	7,8	7,5	8,4	6,3	8,0	6,2
	5,0	5,5	9,5	7,3	12,8	6,6
β (h ⁻¹)	0,0888	0,0924	0,0820	0,1100	0,0866	0,1118
	0,1386	0,1260	0,0729	0,0943	0,0514	0,1050
$AUC^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	1,23	1,32	1,32	1,21	1,29	1,08

Linhas sem sombras = (R)-(+)-metoprolol; linhas sombreadas = (S)-(-)-metoprolol

TABELA iii - Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em urina

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
Ae^{0-24} (mg)	2,65	1,65	1,86	6,36	2,23	6,83	5,61
	3,28	2,16	2,38	6,29	2,58	8,35	5,82
Cl_R (L/h/Kg)	0,0552	0,0541	0,0273	0,0703	0,0569	0,0995	0,1101
	0,0590	0,0540	0,0269	0,0604	0,0611	0,0865	0,0939
Fel/f (%)	1,69	1,05	1,19	4,07	1,42	4,37	3,59
	2,10	1,38	1,53	4,03	1,65	5,35	3,72
kel (h^{-1})	0,136	0,154	0,086	0,067	0,074	0,125	0,198
	0,131	0,154	0,080	0,060	0,080	0,131	0,192
$Ae^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	1,24	1,31	1,28	0,99	1,16	1,22	1,04

Linhas sem sombras = (R)-(+)-metoprolol; linhas sombreadas = (S)-(-)-metoprolol

TABELA iv - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em urina

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
Ae^{0-24} (mg)	2,95	2,70	1,23	3,70	--	5,75
	3,49	3,29	1,59	4,21	--	5,67
Cl_R (L/h/Kg)	0,0661	0,0560	0,0364	0,0320	--	0,1040
	0,0635	0,0516	0,0354	0,0300	--	0,0952
Fel/f (%)	1,89	1,73	0,79	2,37	--	3,68
	2,23	2,11	1,02	2,69	--	3,63
k_{el} (h^{-1})	0,2100	0,2520	0,0983	0,1557	--	0,1091
	0,2069	0,2432	0,1226	0,1386	--	0,1136
$Ae^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	1,18	1,22	1,29	1,14	--	0,99

Linhas sem sombras = (R)-(+)-metoprolol; linhas sombreadas = (S)-(-)-metoprolol
 --não determinado

TABELA v - Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolólico em plasma

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
$C_{\max}$ (ng/mL)	691,8	1178,4	461,7	872,3	733,0	1102,4	599,9
	532,7	875,6	340,8	636,3	645,3	902,8	460,6
$t_{\max}$ (h)	2,0	1,5	2,0	6,0	3,0	2,0	1,5
	2,0	1,5	2,0	6,0	3,0	2,0	1,5
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	5382,2	5054,2	4011,5	13398,1	3807,6	8647,6	4933,3
	4309,7	4123,4	3237,2	8385,0	3485,0	7595,7	3583,4
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,65	1,70	0,74	3,20	1,30	1,22	0,82
	1,70	1,66	1,08	2,58	0,90	1,05	0,90
K_a (h ⁻¹)	0,4200	0,4076	0,9365	0,2166	0,5331	0,5680	0,8451
	0,4076	0,4175	0,6417	0,2686	0,7700	0,6600	0,7700
$t_{1/2\beta}$ (h)	4,35	2,55	5,35	11,30	2,50	5,37	4,80
	3,70	2,75	5,75	8,70	2,70	5,40	4,40
β (h ⁻¹)	0,1593	0,2718	0,1295	0,0613	0,2772	0,1290	0,1444
	0,1873	0,2520	0,1205	0,0796	0,2567	0,1283	0,1575
$AUC^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	0,80	0,82	0,81	0,63	0,91	0,88	0,73

Linhas sem sombras = (R)-(+)-AODM; linhas sombreadas = (S)-(-)-AODM

TABELA vi - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
$C_{\max}$ (ng/mL)	1373,5	1835,6	1845,1	906,8	1543,2	1510,0
	1299,8	1483,9	1562,8	821,0	974,5	1411,0
$t_{\max}$ (h)	2,0	1,5	3,0	3,0	2,0	2,0
	2,0	1,5	3,0	3,0	2,0	2,0
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	14124,6	19256,5	25699,2	11532,1	12608,1	14531,4
	13098,4	17177,1	22593,9	10887,4	10408,6	13594,1
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1,1	1,0	1,0	2,0	1,1	1,35
	0,87	0,6	1,5	1,8	0,9	1,55
K_a (h ⁻¹)	0,6300	0,6930	0,6930	0,3465	0,6026	0,5133
	0,7965	1,1550	0,4471	0,3746	0,7295	0,4471
$t_{1/2\beta}$ (h)	6,3	9,0	10,0	6,9	5,7	6,6
	6,7	8,4	9,0	7,6	6,6	6,6
β (h ⁻¹)	0,1100	0,0770	0,0693	0,1004	0,1216	0,1050
	0,1024	0,0823	0,0770	0,0906	0,105	0,1050
$AUC^{0-24}_{(S)-(-)(R)-(+)}$	0,93	0,89	0,88	0,94	0,82	0,93

Linhas sem sombras = (R)-(+)-AODM; linhas sombreadas = (S)-(-)-AODM

TABELA vii - Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em urina

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
Ae^{0-24} (mg)	30,80	20,85	18,25	55,84	20,95	49,21	43,40
	25,06	18,56	20,75	29,87	22,47	46,46	40,66
Cl_R (L/h/Kg)	0,0715	0,0408	0,0477	0,0575	0,0600	0,0532	0,1100
	0,0727	0,0484	0,0672	0,0491	0,0703	0,0572	0,1418
Cl_M (L/h/Kg)	0,3213	0,3430	0,1335	0,3089	0,2677	0,3134	0,4260
	0,2256	0,2321	0,1173	0,1434	0,2661	0,2403	0,3280
Fe/f (%)	19,72	13,35	11,68	35,75	13,41	31,50	27,79
	16,05	11,88	13,28	19,12	14,38	29,74	26,03
kel (h ⁻¹)	0,1575	0,1732	0,1690	0,0550	0,2166	0,1650	0,1136
	0,1444	0,1824	0,1711	0,0976	0,2009	0,1824	0,1295
$Ae^{0-24}_{(S)-(-)/(R)-(+)}$	0,81	0,89	1,14	0,53	1,07	0,94	0,94

Linhas sem sombras = (R)-(+)-AODM; linhas sombreadas = (S)-(-)-AODM

TABELA viii - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em urina

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
Ae^{0-24} (mg)	45,71	39,26	32,84	45,61	12,62	44,85
	39,78	32,02	28,33	39,97	11,71	39,04
Cl_R (L/h/Kg)	0,0404	0,0244	0,0162	0,0501	0,0098	0,0312
	0,0380	0,0223	0,0159	0,0465	0,0110	0,0291
Cl_M (L/h/Kg)	0,5120	0,4073	0,4851	0,1971	0,1920	0,4057
	0,3617	0,2509	0,3162	0,1423	0,1379	0,3271
Fel/f (%)	29,3	25,1	21,0	29,2	8,1	28,71
	25,5	20,5	18,1	25,6	7,5	24,99
kel (h ⁻¹)	0,0962	0,0787	0,0590	0,0483	0,1610	0,1100
	0,1080	0,0796	0,0554	0,0462	0,1226	0,1490
$Ae^{0-24}_{(S)-(-)/(R)-(+)}$	0,87	0,82	0,86	0,88	0,93	0,87

Linhas sem sombras = (R)-(+)-AODM; linhas sombreadas = (S)-(-)-AODM

TABELA ix - Grupo Controle: disposição cinética estereosseletiva do 1'S- α -hidroximetoprolol em plasma

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
$C_{\max}$ (ng/mL)	9,64	6,90	--	5,02	7,70	9,32	13,28
	9,64	8,64	--	5,41	7,89	13,17	12,06
$t_{\max}$ (h)	2,0	3,0	--	4,0	1,5	2,0	2,0
	2,0	3,0	--	4,0	1,5	3,0	2,0
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	139,36	75,62	--	110,18	82,38	144,57	124,49
	152,05	91,12	--	110,87	88,23	163,26	129,22
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,85	1,15	--	3,14	1,10	1,35	0,65
	0,70	0,90	--	1,57	0,90	1,65	1,00
K_a (h^{-1})	0,8153	0,6026	--	0,2207	0,6300	0,5133	1,0660
	0,9900	0,7700	--	0,4415	0,7700	0,4200	0,6930
$t_{1/2\beta}$ (h)	12,15	5,65	--	27,10	8,10	9,80	7,70
	13,80	5,30	--	41,60	9,65	10,60	8,70
β (h^{-1})	0,0570	0,1226	--	0,0256	0,0855	0,0707	0,0900
	0,0502	0,1307	--	0,0167	0,0718	0,0654	0,0796
$AUC^{0-24}_{2S/2R}$	1,14	1,53	--	1,08	1,20	1,23	1,11

Linhas sem sombras = 1'S,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'S,2S- α -hidroximetoprolol

-- não determinado

TABELA x - Grupo Controle: disposição cinética enantiosseletiva do 1'R- α -hidroximetoprolol em plasma

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
$C_{\max}$ (ng/mL)	17,00	13,39	--	9,46	18,07	21,21	35,80
	22,00	23,50	--	10,42	23,18	26,79	40,50
$t_{\max}$ (h)	2,0	3,0	--	4,0	1,5	2,0	2,0
	2,0	3,0	--	4,0	2,0	2,0	2,0
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	251,48	158,84	--	179,51	184,45	313,14	393,02
	295,58	267,91	--	202,97	232,00	399,65	446,46
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,75	0,40	--	2,70	1,50	1,50	0,63
	1,00	1,25	--	3,02	1,55	1,55	0,90
K_a (h ⁻¹)	0,9240	1,7325	--	0,2567	0,4620	0,4620	1,1000
	0,6930	0,5544	--	0,2295	0,4471	0,4471	0,7700
$t_{1/2\beta}$ (h)	13,80	6,40	--	16,30	6,95	15,10	9,10
	10,75	4,20	--	14,10	6,95	14,00	9,30
β (h ⁻¹)	0,0502	0,1083	--	0,0425	0,0997	0,0459	0,0761
	0,0645	0,1650	--	0,0491	0,0997	0,0495	0,0745
$AUC^{0-24}_{1'R/1'S}$	1,88	2,56	--	1,73	2,44	2,31	3,31

Linhas sem sombras = 1'R,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'R,2S- α -hidroximetoprolol

-- não determinado

TABELA xi - **Grupo IRC:** disposição cinética enantiosseletiva do 1'S- α -hidroximetoprolol em plasma

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
$C_{\max}$ (ng/mL)	15,79	20,33	22,74	9,93	29,78	--
	17,08	23,93	22,42	12,8	35,02	--
$t_{\max}$ (h)	1,5	3,0	3,0	6,0	1,0	--
	1,5	3,0	3,0	6,0	1,0	--
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	203,86	299,18	350,03	156,22	336,33	--
	243,38	370,99	439,84	208,26	456,82	--
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,80	0,50	2,10	3,10	0,20	--
	0,60	0,50	3,15	3,30	0,70	--
K_a (h^{-1})	0,8662	1,3860	0,3300	0,2235	3,465	--
	1,1550	1,3860	0,2200	0,2100	0,9900	--
$t_{1/2\beta}$ (h)	11,2	14,0	10,2	13,7	8,3	--
	12,6	13,0	6,6	13,5	8,5	--
β (h^{-1})	0,0619	0,0495	0,0679	0,0506	0,0835	--
	0,0550	0,0533	0,1042	0,0513	0,0815	--
$AUC^{0-24}_{2S/2R}$	1,26	1,30	1,25	1,24	1,32	--

Linhas sem sombras = 1'S,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'S,2S- α -hidroximetoprolol
 -- não determinado

TABELA xii - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do 1'R- α -hidroximetoprolol em plasma

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
$C_{\max}$ (ng/mL)	47,01	59,94	44,07	35,39	68,75	42,28
	59,61	78,62	56,73	42,57	90,12	43,90
$t_{\max}$ (h)	1,5	3,0	3,0	6,0	1,0	1,5
	1,5	3,0	3,0	6,0	1,0	1,5
AUC^{0-24} (ng.h/mL)	638,41	843,10	775,13	583,48	844,52	519,10
	818,18	1117,00	966,83	706,37	1096,78	542,97
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,75	0,50	2,80	2,55	0,35	0,5
	0,80	0,70	1,70	2,80	0,60	0,5
K_a (h ⁻¹)	0,9240	1,3860	0,2475	0,2718	1,9800	1,3860
	0,8662	0,9900	0,4076	0,2475	1,1550	1,3860
$t_{1/2\beta}$ (h)	11,2	13,0	10,9	12,2	9,5	13,9
	10,9	14,0	16,1	10,7	9,7	12,0
β (h ⁻¹)	0,0619	0,0533	0,0636	0,0568	0,0729	0,0498
	0,0633	0,0495	0,0429	0,0648	0,0711	0,0575
$AUC^{0-24}_{1'R/1'S}$	3,26	2,92	2,20	3,54	2,45	--

Linhas sem sombras = 1'R,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'R,2S- α -hidroximetoprolol

-- não determinado

TABELA xiii - Grupo Controle: disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol em urina

Parâmetro	JLC	MJJC	LAM	MASD	CSB	CAS	ELS
Ae^{0-24} (mg)	1,21	0,82	0,58	0,48	1,09	1,82	1,66
	1,35	1,16	0,74	0,48	1,14	2,15	1,61
	3,65	2,16	1,55	1,61	2,17	4,70	4,68
	4,40	3,24	2,28	1,94	2,76	6,49	5,40
Cl_R (L/h/Kg)	0,1085	0,1171	--	0,0601	0,1449	0,1176	0,1668
	0,1108	0,1374	--	0,0597	0,1415	0,1231	0,1554
	0,1813	0,1467	--	0,1237	0,1283	0,1403	0,1490
	0,2031	0,1304	--	0,1318	0,1298	0,1518	0,1512
Cl_M (L/h/Kg)	0,0119	0,0128	0,0040	0,0025	0,0132	0,0109	0,0153
	0,0114	0,0137	0,0039	0,0022	0,0128	0,0105	0,0122
	0,0359	0,0336	0,0107	0,0084	0,0263	0,0283	0,0434
	0,0408	0,0383	0,0122	0,0088	0,0308	0,0317	0,0411
Fel/f (%)	0,73	0,50	0,35	0,29	0,66	1,10	1,00
	0,81	0,70	0,45	0,29	0,69	1,30	0,97
	2,20	1,31	0,94	0,97	1,31	2,84	2,83
	2,90	1,96	1,38	1,17	1,67	3,92	3,26
kel (h^{-1})	0,0686	0,1050	0,0573	0,0722	0,0845	0,0630	0,0577
	0,0563	0,0997	0,0441	0,0683	0,0877	0,0541	0,0679
	0,0866	0,1155	0,0654	0,0465	0,1058	0,0726	0,0669
	0,0894	0,1205	0,0707	0,0471	0,1074	0,0729	0,0642
$Ae^{0-24}_{2S/2R}$	1,27	1,47	1,42	1,16	1,20	1,32	1,10
$Ae^{0-24}_{1'R/1'S}$	3,30	2,72	2,91	3,70	2,20	2,82	3,09

Linhas sem sombras = 1'S,2R e 1'R,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'S,2S e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol respectivamente

TABELA xiv - Grupo IRC: disposição cinética enantiosseletiva do α -hidroximetoprolol em urina

Parâmetro	LSS	BMS	ALR	MDSM	BAS	JCG
Ae^{0-24} (mg)	1,26	1,80	1,11	1,06	0,82	3,04
	1,56	1,90	1,27	1,16	1,09	2,89
	3,91	5,25	2,52	3,02	2,69	7,11
	4,68	7,03	3,36	3,25	3,87	7,18
Cl_R (L/h/Kg)	0,0775	0,0719	0,0402	0,0856	0,0240	--
	0,0803	0,0614	0,0367	0,0706	0,0234	--
	0,0766	0,0746	0,0413	0,0655	0,0312	0,1386
	0,0715	0,0754	0,0441	0,0583	0,0346	0,1338
Cl_M (L/h/Kg)	0,0134	0,0176	0,0154	0,0043	0,0118	0,0260
	0,0134	0,0136	0,0134	0,0039	0,0121	0,0229
	0,0414	0,0514	0,0352	0,0123	0,0386	0,0607
	0,0401	0,0520	0,0354	0,0109	0,0430	0,0567
Fe/f (%)	0,76	1,08	0,67	0,64	0,50	1,84
	0,94	1,11	0,77	0,70	0,66	1,75
	2,36	3,17	1,52	1,82	1,62	4,30
	2,83	4,25	2,03	1,96	2,34	4,33
kel (h^{-1})	0,0693	0,1066	0,0546	0,0749	0,0861	0,0533
	0,0587	0,0990	0,0480	0,0550	0,0624	0,0513
	0,0613	0,1050	0,0550	0,0645	0,0679	0,0679
	0,0679	0,1127	0,0568	0,0642	0,0679	0,0745
$Ae^{0-24}_{2S/2R}$	1,21	1,27	1,28	1,08	1,41	0,99
$Ae^{0-24}_{1'R/1'S}$	3,04	3,32	2,38	2,83	3,43	2,41

Linhas sem sombras = 1'S,2R e 1'R,2R- α -hidroximetoprolol; linhas sombreadas = 1'S,2S e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol respectivamente

Figura i. **Grupo Controle-** Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros (R)-(+)-metoprolol (-) e (S)-(-)-metoprolol (-) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

Figura ii. **Grupo IRC-** Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros (R)-(+)-metoprolol (-) e (S)-(-)-metoprolol (-) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

Figura iii. **Grupo Controle-** Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os isômeros 1'S,2R- (---), 1'S,2S- (---), 1'R,2R- (---) e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol (---) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

Figura iv. **Grupo IRC-** Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os isômeros 1'S,2R- (---), 1'S,2S- (---), 1'R,2R- (---) e 1'R,2S-α-hidroximetoprolol (-.-) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

Figura v. **Grupo Controle**- Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros (R)-(+)- (-) e (S)-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico (-) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

Figura vi. **Grupo IRC-** Curvas individuais de concentração plasmática *versus* tempo para os enantiômeros (R)-(+)- (-) e (S)-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico (-) após administração de doses múltiplas de 200mg de tartarato de metoprolol racêmico

APÊNDICE 5

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO