

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas

Natalícia de Jesus Antunes

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de **Mestre em CIÊNCIAS**

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Natalícia de Jesus Antunes

Orientadora: Profa Dra Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2010

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

Antunes, Natalícia de Jesus

Influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas; Orientadora: Vera Lucia Lanchote. Ribeirão Preto, 2010.

84p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Lanchote, Vera Lucia

1. Metoprolol;
2. Enantiômeros;
3. Farmacocinética;
4. Diabetes *mellitus* gestacional;
5. Parturientes;
6. Hipertensão arterial.

Folha de Aprovação

Natalícia de Jesus Antunes

Influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa Dra Vera Lucia
Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatoria

Dedico este trabalho:

À Deus, por me conceder mais uma oportunidade de crescimento e força para superar os desafios ao longo dessa caminhada.

À minha mãe Terezinha, minha base, meu exemplo de vida, pela educação a mim dispensada, pela minha formação e pelos mais belos exemplos de honestidade, dignidade e perseverança. Pela compreensão e apoio, ainda que de longe, em todos os momentos difíceis da minha vida. E, sobretudo, pelo imprescindível e incondicional amor de sempre.

Às minhas irmãs Eva e Maria Aparecida, meu irmão Valdemir e aos meus sobrinhos Fernando, Cláudio, André, Junior, Reginaldo, Fabrício, Claudinéia, Cristiane e Maria Fernanda pelo carinho e alegrias que sempre me proporcionam.

Agradecimientos

Meus sinceros agradecimentos

À Profa Dra Vera Lucia Lanchote, pela orientação, pelos ensinamentos edificantes, pelo respeito e confiança a mim sempre dispensados.

Às pacientes, que em um momento tão difícil de suas vidas aceitaram participar desse trabalho, dando a sua colaboração indispensável para a realização do mesmo.

À Maria Paula pelos ensinamentos e pela ajuda constante na execução desse trabalho.

Ao Sr Natalino pela ajuda e por tornar o laboratório um ambiente mais alegre.

A todos os colegas e amigos do Laboratório: Ana Leonor, Carolina Miranda, Carolina Pinto, Bruno, Daniel, Fernanda, Flávia, Francine, Glauco, Juciane, Leonardo, Natália, Renata, Estela, Rodrigo, Teresa e Vanessa, pelas trocas de experiências profissionais e pessoais, pela inestimável ajuda e pelo carinho no nosso convívio diário.

À Juciane, Fernanda e Rodrigo pelo carinho e pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela parceria e contribuição no desenvolvimento do trabalho clínico, na seleção e coleta das amostras das pacientes.

À Dra Elaine Christine Dantas Moisés pelos ensinamentos e pela disponibilidade em ajudar na realização deste trabalho.

Às funcionárias da seção de Pós-graduação, Ana e Rosana, pela dedicação e paciência.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP por possibilitar a realização do mestrado.

Às minhas amigas Ana Taísa, Fernanda, Gisele, Lidiane, Nunila, Vânia e Viviana pela amizade e apoio tão fundamentais.

À Marcelo pelo incentivo, auxílio e amizade.

Aos moradores das casas 12 e 13, pela convivência que muito contribuiu para o meu crescimento pessoal.

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

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

Epígrafe

“A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio.”

(Martin Luther King Jr)

Resumo

ANTUNES, N.J. Influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas. 2010. 84f. **Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.**

O metoprolol, um fármaco aceito no tratamento da hipertensão durante a gestação, está disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros S-(-) e R-(+), embora o S-(-)-metoprolol seja considerado o eutômero em termos do bloqueio do receptor β_1 adrenérgico. O presente estudo avalia a influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas. As parturientes hipertensas investigadas (n=35) com idade gestacional de 35-42 semanas e fenotipadas como metabolizadoras extensivas tipo metoprolol, foram distribuídas nos grupos controle (n=24) ou portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (n=11). As parturientes foram tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico 1-11 h antes do parto. Foram coletadas amostras seriadas de sangue materno (0-24h) e no momento do parto foram coletados simultaneamente sangue materno, sangue do cordão umbilical e líquido amniótico. Os enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos foram quantificados por LC-MS/MS ou por detecção por fluorescência. A disposição cinética do metoprolol é enantiosseletiva em parturientes hipertensas com observação de maiores concentrações plasmáticas ($AUC^{0-\infty}$ 113,42 vs 62,65 ng.h/mL) e menor *clearance* total aparente (344,21 vs 623,14 L/h) para o eutômero S-(-)-metoprolol. A formação do metabólito α -hidroximetoprolol também é estereosseletiva com favorecimento do novo centro quiral 1'R ($AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S=2,84). O favorecimento da formação do R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico ($AUC^{0-\infty}$ 2,77 vs 2,66 μ g.h/mL) explica o acúmulo plasmático do S-(-)-metoprolol. O Diabetes *mellitus* gestacional compensado prolonga o t_{max} para ambos os enantiômeros do metoprolol (1,5 vs 2,5 h) e ácido O-desmetilmetoprolóico (2,0 vs 3,5 h) e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol (2,0 vs 3,0 h). O Diabetes *mellitus* gestacional compensado não altera as razões isoméricas de concentrações plasmáticas do metoprolol, α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico. As razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno obtidas para ambos os enantiômeros do metoprolol (3,0 para o R-(+)-metoprolol e 3,2 para o S-(-)-metoprolol) e para os isômeros do α -hidroximetoprolol (5,1 para o 1'S,2R; 4,0 para o 1'S,2S; 1,6 para o 1'R,2R e 2,3 para o 1'R,2S) evidenciam maiores concentrações dos fármacos no líquido amniótico do que no plasma materno. No entanto, os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico atingem menores concentrações no líquido amniótico do que no plasma materno das parturientes hipertensas (líquido amniótico/plasma materno = 0,29 e 0,37 respectivamente para os enantiômeros R-(+)- e S-(-)). A distribuição transplacentária é próxima a 1 para ambos os enantiômeros do metoprolol e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol e próxima a 0,8 para ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em parturientes hipertensas. O Diabetes *mellitus* gestacional compensado reduz em aproximadamente 20% a distribuição transplacentária dos isômeros 1'S,2S; 1'R,2R; e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol mas não altera a distribuição dos enantiômeros do metoprolol.

Palavras-chave: metoprolol, enantiômeros, farmacocinética, Diabetes *mellitus* gestacional, parturientes, hipertensão arterial.

Abstract

ANTUNES, N.J. **Influence of gestational Diabetes *mellitus* on the enantioselective kinetic disposition and metabolism of metoprolol in hypertensive parturients.** 2010. 84p. Dissertation (Master Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Metoprolol is a drug accepted in the treatment of hypertension during pregnancy and it is clinically available as a racemic mixture of its enantiomers S-(-) and R-(+) metoprolol, although S-(-)-metoprolol is considered the eutomer responsible for β_1 adrenergic receptor blockade. This study evaluates the influence of gestational Diabetes *mellitus* on the kinetic disposition and metabolism of metoprolol enantiomers in hypertensive parturients. The investigated parturients (n=35) presented gestational age within 35 to 42 weeks, were phenotyped as extensive metabolizers of metoprolol and were distributed in the control group (n=24) or in the gestational Diabetes *mellitus* group (n =11). The parturients were treated with single oral dose of 100 mg racemic metoprolol tartrate 1-11 h before delivery. Maternal blood samples were collected until 24h after drug administration, whereas maternal blood, umbilical cord blood and amniotic fluid were simultaneously collected at delivery. Metoprolol enantiomers and its metabolites were quantified by LC-MS/MS or by fluorescence detection. Kinetic disposition of metoprolol is enantioselective in hypertensive parturients with observation of higher plasma concentrations ($AUC^{0-\infty}$ 113.42 vs 62.65 ng.h/mL) and lower apparent total clearance (344.21 vs 623.14 L/h) for the S-(-)-metoprolol eutomer. The formation of α -hydroxymetoprolol metabolite is also stereoselective in favor of the new chiral center 1'R ($AUC^{0-\infty}$ $_{1'R/1'S} = 2.84$). The formation in favor of R-(+)-metoprolol acid metabolite ($AUC^{0-\infty}$ 2.77 vs 2.66 μ g.h/mL) explains the plasma accumulation of S-(-)-metoprolol. Gestational Diabetes *mellitus* prolongs t_{max} for both metoprolol enantiomers (1.5 vs 2.5 h), metoprolol acid metabolite (2.0 vs 3.5 h) and for all α -hydroxymetoprolol isomers (2.0 vs 3.0 h). Gestational Diabetes *mellitus* does not alter the isomeric ratios of plasma concentrations of metoprolol, α -hydroxymetoprolol and metoprolol acid metabolite. The concentrations of both metoprolol enantiomers (amniotic fluid/maternal plasma = 3.0 for R-(+)-metoprolol and 3.2 for the S-(-)-metoprolol) and α -hydroxymetoprolol isomers (liquid amniotic fluid/maternal plasma = 5.1 for 1'S,2R; 4.0 for 1'S,2S; 1.6 for 1'R,2R and 2.3 for 1'R,2S) are higher in amniotic fluid than in maternal plasma. However, metoprolol acid metabolite enantiomers reach lower concentrations in amniotic fluid than in maternal plasma of hypertensive parturients (amniotic fluid/maternal plasma = 0.29 and 0.37 respectively for the R-(+)- and S-(-)-enantiomers). The transplacental distribution is approximately 1 for both enantiomers of metoprolol and all isomers of α -hydroxymetoprolol and approximately 0.8 for both metoprolol acid metabolite enantiomers in hypertensive parturients. Gestational Diabetes *mellitus* reduces in approximately 20% the transplacental distribution of the isomers 1'S,2S; 1'R,2R and 1'R,2S- α -hidroximetoprolol but does not alter the transplacental distribution of both metoprolol enantiomers.

Keywords: metoprolol; enantiomers; pharmacokinetics; gestational Diabetes *mellitus*; parturient; hypertension.

Lista de Figuras

Figura 1:	Metabolismo oxidativo do metoprolol	4
Figura 2:	Gráfico do tamanho amostral da amostra em relação ao poder do teste	12
Figura 3:	Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do metoprolol e do íon molecular protonado e do íon produto do α -hidroximetoprolol.....	27
Figura 4:	Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α - hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico	28
Figura 5:	Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico	37
Figura 6:	Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III) em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13).....	42
Figura 7:	Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10).....	47
Figura 8:	Razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno em função dos tempos entre a administração do metoprolol e a colheita das amostras em parturientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=11).....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Características das pacientes investigadas.....	24
Tabela 2:	Parâmetros bioquímicos das pacientes investigadas	25
Tabela 3:	Parâmetros hemodinâmicos das pacientes investigadas 2h após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	26
Tabela 4:	Características dos recém-nascidos das pacientes investigadas ...	26
Tabela 5:	Efeito matriz para os enantiômeros do metoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano	29
Tabela 6:	Efeito matriz para os isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano....	29
Tabela 7:	Efeito matriz para os enantiômeros do metoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de líquido amniótico.....	29
Tabela 8:	Efeito matriz para os isômeros do α -hidroximetoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de líquido amniótico.....	30
Tabela 9:	Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) em plasma.....	31
Tabela 10:	Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em plasma.....	32
Tabela 11:	Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) e dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em plasma	33
Tabela 12:	Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) em líquido amniótico	34
Tabela 13:	Limites de confiança do método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em líquido amniótico	35
Tabela 14:	Estudo da estabilidade do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) e dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em líquido amniótico	36
Tabela 15:	Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em líquido amniótico.....	38
Tabela 16:	Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em líquido amniótico ...	39

Tabela 17:	Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=25).....	40
Tabela 18:	Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13).....	43
Tabela 19:	Disposição cinética dos isômeros do α -hidroximetoprolol em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13).....	44
Tabela 20:	Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13).....	45
Tabela 21:	Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10).....	48
Tabela 22:	Disposição cinética dos isômeros do α -hidroximetoprolol em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10).....	49
Tabela 23:	Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10).....	50
Tabela 24:	Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10)	51
Tabela 25:	Disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol (OHM) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10).....	51
Tabela 26:	Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10)....	52
Tabela 27:	Concentrações dos enantiômeros do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	53
Tabela 28:	Concentrações dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	54

Tabela 29:	Concentrações dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	55
Tabela 30:	Concentrações dos enantiômeros do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	56
Tabela 31:	Concentrações dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico	57
Tabela 32:	Concentrações dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes <i>mellitus</i> gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico.....	58
Tabela 33:	Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD	59
Tabela 34:	Disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD	59
Tabela 35:	Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD	59

Lista de Abreviaturas e Síglas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AGP: α -glicoproteína ácida

AODM: ácido O-desmetilmetoprolóico

α -OHM: α -hidroximetoprolol

cAMP: adenosina monofostato cíclico

CCr: *clearance* de creatinina

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo P450

DM: Diabetes *mellitus*

DMG: Diabetes *mellitus* gestacional

EM: metabolizador extensivo

EPM: erro padrão da média

ESI: eletronebulização

γ -GT: gama glutamil transferase

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HCFMRP: Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina Ribeirão Preto

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

IC 95%: índice confiança 95%

IMC: índice de massa corporal

LIQ: limite inferior de quantificação

LC: cromatografia líquida

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

MET: metoprolol

MTR: Tempo médio de residência

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: espectrometria de massas

N-DAM: N-desalquilmetoprolol

PI: padrão interno

PGP: glicoproteína P

PM: metabolizadores pobres

r: coeficiente de correlação linear

AST: aspartato aminotransaminase

ALT: alanina aminotransaminase

v/v: volume/volume

Lista de Símbolos

AUC^{0-∞}: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Cl: *clearance* total

Cl/f: *clearance* total aparente

C_{max}: concentração plasmática máxima

t_{max}: tempo para alcançar C_{max}

Ka: constante velocidade absorção

t_{1/2} : meia-vida de eliminação

Vd: volume de distribuição

Vd/f: volume de distribuição aparente

®: marca registrada

Sumário

<i>Resumo</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>v</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de Abreviaturas e Siglas</i>	<i>xv</i>
<i>Lista de Símbolos</i>	<i>xviii</i>
1 Introdução	1
2 Objetivos	8
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos	9
3 Casuística e Métodos	10
3.1 Casuística	11
3.1.1 Aspectos éticos do projeto	11
3.1.2 Cálculo amostral	11
3.1.3 Seleção das pacientes	12
3.1.3.1 Critérios diagnósticos	12
3.1.3.2 Critérios de inclusão	12
3.1.3.3 Critérios de exclusão.....	13
3.2 Protocolo clínico	13
3.3 Análise enantiosseletiva do metoprolol e seus metabólitos em plasma e em líquido amniótico	14
3.3.1 Soluções padrão e reagentes	14
3.3.2 Análise dos isômeros do metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e em líquido amniótico	15
3.3.2.1 Preparo das amostras	15
3.3.2.2 Determinação do efeito matriz.....	16
3.3.2.3 Curvas de calibração	16
3.3.2.4 Validação do método de análise dos enantiômeros do metoprolol e do α -hidroximetoprolol em plasma e em líquido amniótico	16
3.3.2.4.1 Recuperação.....	17
3.3.2.4.2 Linearidade e limite de quantificação	17
3.3.2.4.3 Precisão e exatidão.....	17
3.3.2.4.4 Estabilidade.....	18
3.3.3 Análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e líquido amniótico	19
3.3.3.1 Preparo das amostras	19
3.3.3.2. Validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma	19
3.3.3.3 Validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico	20
3.3.3.3.1 Linearidade e limite de quantificação	20
3.3.3.3.2 Precisão e exatidão.....	21
3.3.3.3.3 Estabilidade.....	21
3.4 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol	22
3. 5 Análise farmacocinética.....	22
3. 6 Análise estatística	22

4	<i>Resultados</i>	23
4.1	Características das pacientes investigadas	24
4.2	Método	27
4.2.1	Análise enantiosseletiva do metoprolol e seus principais metabólitos	27
4.2.1.1	Análise enantiosseletiva do metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico	27
4.2.1.2	Análise enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoproloico em líquido amniótico	37
4.3	Fenótipo oxidativo tipo metoprolol (CYP2D6)	40
4.4	Disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas incluídas no grupo controle (Grupo H)	41
4.5	Disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes mellitus gestacional (Grupo HD)	46
4.6	Distribuição transplacentária e no líquido amniótico dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos	53
5	<i>Discussão</i>	61
6	<i>Conclusões</i>	74
7	<i>Referências Bibliográficas</i>	76

1 Introdução

Os enantiômeros individuais de um racemato, caracterizados por diferentes orientações espaciais, podem manifestar diferentes efeitos farmacológicos em razão das exigências conformacionais implícitas no processo de ligação dos fármacos a receptores específicos. Conseqüentemente, o tratamento com um fármaco racêmico constitui para a terapêutica uma combinação fixa de medicamentos com diferentes propriedades farmacológicas e diferentes potenciais de manifestação de toxicidade (BROCKS, 2006).

A farmacocinética também é capaz de discriminar entre os enantiômeros. O fenômeno da enantiosseletividade é observado nas situações de interação do fármaco com macromoléculas biológicas quirais, tais como na absorção dependente de carreadores, na ligação às proteínas plasmáticas, nos processos de secreção biliar, excreção renal e no metabolismo. Do conhecimento até então existente, o metabolismo é o processo que apresenta maior grau de enantiosseletividade na disposição de fármacos quirais (XIAOTAO et al.,1995; KROEMER et al.,1996; BROCKS, 2006).

A identificação dos fatores responsáveis pelas 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 e a interação de fármacos são reconhecidos como preponderantes. Por outro lado, a influência de doenças é ainda muito pouco investigada (TUCKER et al.,1990; NATION,1994; RODEN,1994; DUCHARME et al.,1996; KROEMER et al.,1996; BROCKS, 2006).

A gravidez é considerada um estado fisiológico associado com alterações na disposição cinética e metabolismo de fármacos. A atividade do CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 e da uridina difosfato glicuronosiltransferase (UGT1A4 e UGT2B7) aumenta durante o período gestacional, enquanto são descritos relatos de redução no metabolismo de fármacos dependente do CYP1A2 e CYP2C19 (ANDERSON, 2005).

O volume de distribuição de medicamentos geralmente é aumentado na gestação em função do aumento do volume do líquido extracelular, da menor concentração plasmática de albumina e α_1 -glicoproteína ácida e do aumento da concentração de ácidos graxos livres. O *clearance* renal também é aumentado durante a gestação em razão do aumento do fluxo de sangue renal. Essas alterações podem traduzir em menores concentrações plasmáticas de

medicamentos quando gestantes são tratadas com regimes de doses convencionais (KNOTT et al., 1990; LOEBSTEIN et al., 1997; ANDERSON, 2005).

Várias doenças podem provocar alterações nos processos farmacocinéticos enantiosseletivos. Essas alterações se devem principalmente a modificações nas concentrações de proteínas plasmáticas, alterações na atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos e alterações das funções renal, hepática, cardíaca entre outras. A atividade enzimática e a expressão de genes do CYP (citocromo P450) podem ser profundamente alteradas por doenças, entretanto essas alterações podem ser enzimas seletivas e a seletividade variar dependendo da doença (CHENG et al., 2001).

A hipertensão acomete 5-7% das gestantes, é responsável por 18% das doenças maternas nos Estados Unidos e considerada como a principal causa de mortalidade e morbidade materna e perinatal no mundo inteiro (MAGEE et al., 2007; BARTON, 2008, LINDHEIMER et al., 2010). As gestantes com hipertensão estão predispostas a desenvolver complicações como o deslocamento prematuro da placenta, coagulação intravascular disseminada, hemorragia cerebral, falência hepática e renal, entre outras (FERRÃO et al., 2006).

O tratamento da hipertensão grave em gestantes tem o objetivo de prevenir potenciais complicações cerebrovasculares e cardiovasculares como encefalopatia, hemorragia e falência congestiva do coração e ainda, possíveis complicações fetais pelo abrupto deslocamento placentário com resultante coagulopatia intravascular disseminada (BARTON, 2008). Estudos baseados em dados coletados entre 1980 e 1999 sugerem que aproximadamente 2% das mulheres nos Estados Unidos usam fármacos cardiovasculares durante a gestação (ANDRADE et al., 2008).

Os β -bloqueadores são agentes anti-hipertensivos aceitos na terapia de todos os tipos de hipertensão na gestação (MAGEE et al., 1999) em razão do baixo risco fetal e neonatal (SANDSTRÖN, 1978; SANDSTRÖN, 1982; LINDEBERG et al., 1984); FINNSTROM et al., 1984).

Em 2006, o succinato de metoprolol – classificado como risco C para gestantes - foi incluído na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – Renome 2006 como fármaco preferencial no tratamento da hipertensão em gestantes, por apresentar menores riscos que os demais β -bloqueadores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O metoprolol [1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propan-2-ol] (MET) é um fármaco disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros S-(-) e R-(+) (SPAHN et al., 1989; HERRING et al., 1991; LI et al., 1995). O enantiômero S-(-)-metoprolol expressa atividade 25 vezes maior no bloqueio do receptor β_1 adrenérgico quando comparado ao enantiômero R-(+)-metoprolol (MURTHY et al., 1990; WAHLUND et al., 1990).

O metabolismo oxidativo do metoprolol representa 85% da sua eliminação e envolve três principais vias metabólicas: O-desmetilação, com subsequente e rápida oxidação, hidroxilação alifática e desaminação oxidativa, que formam os metabólitos correspondentes O-desmetilmetoprolol (ODM) e ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM), α -hidroximetoprolol (α -OHM) e N-desalquilmetoprolol (N-DAM). O metabolismo oxidativo do metoprolol está representado na figura 1.

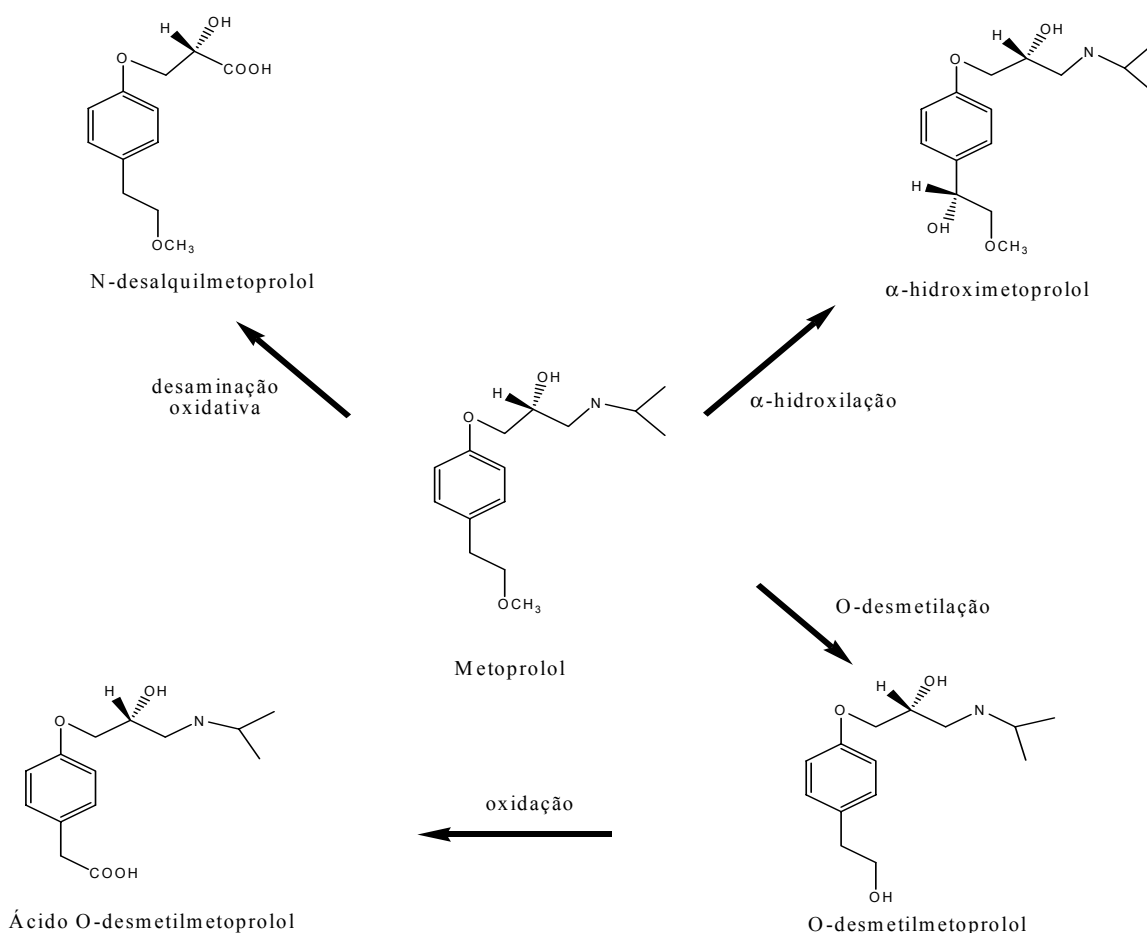


Figura 1: Metabolismo oxidativo do metoprolol (MURTHY et al., 1990).

O produto da O-desmetilação, que é a via quantitativamente mais importante, é oxidado na função álcool primário, resultando no ácido O-desmetilmetoprolóico, 4-(2-hidróxi-3-isopropilaminopropoxi) ácido fenilacético, que é responsável pela eliminação de 65% da dose em humanos (MURTHY et al., 1990). O *clearance* de formação do ácido O-desmetilmetoprolóico é significativamente menor em metabolizadores lentos da debrisoquina que em metabolizadores extensivos (LENNARD et al., 1985), embora a diferença seja menor que para a α -hidroxilação.

Já o α -hidroximetoprolol que apresenta aproximadamente 1/10 da atividade do metoprolol e é considerado pouco significativo na contribuição do efeito farmacológico (GODBILLON & DURVAL, 1984; BALMÉR et al., 1991; FOSTER & MACDONALD, 1999), contribui para a eliminação de somente 10% da dose (LANCHOTE et al., 2000). A formação deste metabólito é dependente da atividade geneticamente determinada do CYP2D6 e relaciona-se com o fenótipo de oxidação tipo debrisoquina/esparteína (LENNARD et al., 1986). A atividade do CYP2D6 é determinante na capacidade de α -hidroxilação de ambos os enantiômeros do metoprolol mas afeta principalmente o metabolismo do R-(+)-metoprolol em voluntários sadios genotipados como metabolizadores ultra-rápidos para o CYP2D6 (SEERINGER et al., 2008).

Estudos realizados em microsomas de fígado humano, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sugerem que a α -hidroxilação e a O-desmetilação são preponderantes para o enantiômero R-(+)-metoprolol. Conseqüentemente, o fenótipo oxidativo dependente da atividade do CYP2D6 e a enantiosseletividade representam as maiores causas da variabilidade interindividual na farmacocinética e na farmacodinâmica do metoprolol (HERRING et al., 1991). O CYP2D6 e o CYP3A também participam da O-desmetilação do metoprolol, embora outras isoformas do CYP também estejam envolvidas (MURTHY et al., 1990; BORALLI, 2006).

O metabolismo do metoprolol é altamente dependente do CYP2D6, o qual é geneticamente controlado e apresenta distribuição polimórfica em humanos (HERRING et al., 1991). O metoprolol é um fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP2D6. Estudos anteriores mostram boa correlação entre a razão metabólica metoprolol/ α -hidroximetoprolol com base nos valores de AUC^{0-12h} e com base em amostras de plasma obtidas 3 h após a administração do fármaco (FRANK et al., 2007). Boralli, 2006 relata correlação significativa ($r=0,949$) entre a α -hidroxilação do

metoprolol e a 4-hidroxição da debrisoquina em voluntários sadios e pacientes portadores de Diabetes *mellitus* tipo 2, sugerindo que as duas vias metabólicas são controladas, essencialmente, pelo CYP2D6 e que tanto a debrisoquina quanto o metoprolol podem ser empregados como fármacos marcadores do CYP2D6 em brasileiros auto-reportados como brancos. A correlação entre a α -hidroxição do metoprolol e a 4-hidroxição da debrisoquina também foi observada nas populações britânica, japonesa e turca, embora metabolizadores lentos da debrisoquina não tenham sido fenotipados como metabolizadores lentos do metoprolol em nigerianos e em populações sul africanas (BASCI et al., 1994).

O *clearance* oral do metoprolol durante o terceiro trimestre da gestação é de $9,56 \pm 2,70$ L/min em comparação com valores de $1,71 \pm 0,39$ L/min 3-6 meses após o parto. A biodisponibilidade oral do metoprolol aumenta por um fator de 1,3 a 3,7 após a gestação. O aumento do *clearance* oral do metoprolol é explicado em função do aumento nos níveis de hormônios esteróides na gravidez, que possuem ação estimulante sobre o sistema monooxigenases. Esses hormônios são substratos do mesmo sistema enzimático responsável pela oxidação de fármacos (HÖGSTEDT et al., 1985). A distribuição transplacentária do metoprolol é de aproximadamente 100%. Há também relatos de distribuição do metoprolol no líquido amniótico com razões de concentrações plasma/fluido amniótico > 1 nas primeiras horas após a administração do metoprolol e < 1 nos tempos subseqüentes (LINDEBERG et al., 1984; SANDSTRÖN, 1982).

O Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é uma das disfunções obstétricas mais freqüentes que ocorrem durante a gravidez, representa aproximadamente 90 % de todas as gestações complicadas por diabetes, sendo sua prevalência estimada em 1 a 14 %, dependendo da população estudada, e relaciona-se a aumento de morbidade e mortalidade perinatais (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; SIBAI & ROSS, 2010). O DMG é caracterizado por intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico pela primeira vez durante a gestação, e que pode ou não persistir após o parto e está associado com o aparecimento de hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia de grau leve a grave (BRYSON et al., 2003; ÖSTLUND et al., 2004; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

O Diabetes *mellitus* (DM) pode alterar a disposição cinética e o metabolismo dos fármacos em uso na clínica dependendo do tipo e do tempo de diagnóstico da

doença, assim como do substrato investigado. Ressalta-se também que a concentração plasmática de lipoproteínas e proteínas pode estar alterada em pacientes diabéticos. A elevada concentração de ácidos graxos livres e proteínas glicadas podem alterar a extensão da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas (EMAMI et al., 1998). Estudos clínicos e experimentais vêm demonstrando que o DM pode alterar a atividade de diversas enzimas, dentre as quais do CYP, provocando modificações diferenciadas na expressão de suas isoformas (SHAW, 2001).

Alterações no metabolismo enantiosseletivo dos fármacos quirais disponíveis na clínica como misturas racêmicas foram observadas em trabalhos do nosso grupo de pesquisa. Na investigação da estereosseletividade na farmacocinética da fluvastatina em ratos com diabetes experimental induzida por estreptozotocina ocorreu uma redução na razão $AUC_{(-)}/AUC_{(+)}$ em razão do aumento no *clearance* do enantiômero (-)-(3S,5R)-fluvastatina nos animais diabéticos (ROCHA et al., 2002). Houve aumento no metabolismo do fenoprofeno em ratos com DM experimental induzido por estreptozotocina com sugestão de aumento unidirecional na velocidade de inversão quiral do enantiômero R ao eutômero S (POGGI et al., 2004). Os dados obtidos na investigação da enantiosseletividade na disposição cinética da nisoldipina em pacientes hipertensos portadores de DM tipo 2 e empregando a lidocaína como fármaco marcador do CYP3A/CYP1A2, sugerem que o diabetes inibe o CYP3A/CYP1A2 com conseqüente redução no *clearance* de ambos os enantiômeros da nisoldipina (MARQUES et al., 2002). A redução do *clearance* aparente (Cl/f) da lidocaína em pacientes com DMG, sugerindo inibição do CYP1A2 e o CYP3A4 foi relatada por Moisés et al., (2008).

Considerando que a hipertensão e o DMG representam as doenças mais freqüentes manifestadas durante a gestação (SIBAI & ROSS, 2010), considerando a capacidade do Diabetes *mellitus* de modificar a atividade de sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de fármacos (SHAW, 2001), o presente estudo avalia a influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas tratadas com o fármaco racêmico em regime de dose única oral. O estudo também abrange a avaliação da distribuição transplacentária e no líquido amniótico dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos.

2.1 Geral

Avaliar a influência do Diabetes *mellitus* gestacional compensado na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol em parturientes hipertensas tratadas com o fármaco racêmico em regime de dose única oral.

2.2 Específicos

- Avaliar a influência da enantiosseletividade no metabolismo do metoprolol em parturientes hipertensas não portadoras do Diabetes *mellitus* gestacional.
- Avaliar a influência da enantiosseletividade no metabolismo do metoprolol em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional compensado.
- Avaliar a influência do Diabetes *mellitus* gestacional compensado na distribuição no líquido amniótico dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas.
- Avaliar a influência do Diabetes *mellitus* gestacional compensado na distribuição transplacentária dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas.

3.1 Casuística

3.1.1 Aspectos éticos do projeto

O projeto aprovado em 26 de maio de 2008 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo HCRP 3974/2008 (ANEXO 1), foi desenvolvido no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.

Ressalta-se que esta pesquisa não interferiu na conduta clínica adotada nos casos, sendo que a evolução obstétrica da paciente seguiu os protocolos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Todas as pacientes investigadas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), sendo garantida a liberdade a se recusarem a participar ou retirarem seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado e/ou tratamento.

3.1.2 Cálculo amostral

O cálculo do número de pacientes foi realizado utilizando o programa *Power and Sample Size* versão 2.1.31 (Vanderbilt, EUA), considerando a variabilidade na farmacocinética dos enantiômeros do metoprolol em voluntários sadios tratados com dose única do fármaco racêmico (BORALLI, 2006) e utilizando os dados do enantiômero de maior variabilidade inter-individual R-(+)-metoprolol. Considerando um poder de 80%, erro padrão tipo I de 5%, a média dos valores de AUC (468,60 ng.h/mL) e o desvio padrão (288,98 ng.h/mL) para o enantiômero R-(+)-metoprolol e uma diferença de pelo menos 50% entre os grupos de parturientes hipertensas e hipertensas diabéticas, deverão ser incluídas na investigação 25 parturientes (Figura 2).

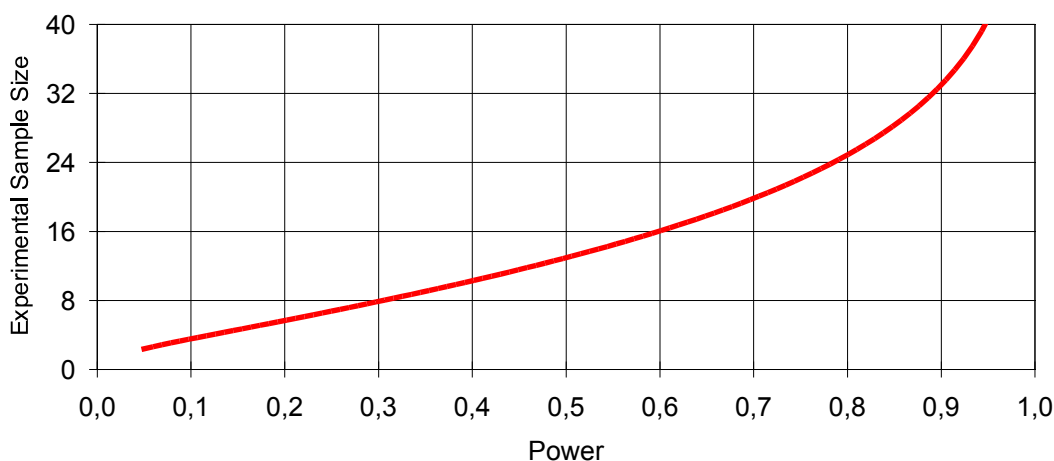


Figura 2: Gráfico do tamanho amostral da amostra em relação ao poder do teste.

3.1.3 Seleção das pacientes

3.1.3.1 Critérios diagnósticos

O diagnóstico de hipertensão arterial foi realizado com base nos critérios do *National High Blood Pressure Education Program* (NHBEP, 2000). O diagnóstico do DMG foi realizado como preconizado pela Organização Mundial da Saúde de acordo com o teste oral de tolerância à glicose com sobrecarga de 75 g de glicose anidra (TOTG-75) e medidas da glicemia de jejum e de 2 horas. O diagnóstico de DMG ocorreu nas situações de glicemia de jejum igual ou maior que 126 mg/dL e/ou glicemia de 2 horas igual ou maior que 140 mg/dL (WHO, 1999).

3.1.3.2 Critérios de inclusão

As parturientes hipertensas investigadas (n= 35) com gestação não gemelar, idade inferior a 45 anos, idade gestacional de 36-42 semanas e ausência de intercorrências fetais foram atendidas no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP. Essas parturientes foram distribuídas em 02 grupos de acordo com as seguintes características:

- Parturientes hipertensas não portadoras do Diabetes *mellitus* gestacional (n=24).
- Parturientes hipertensas portadoras do Diabetes *mellitus* gestacional (n=11).

Foram incluídas somente pacientes sem uso de insulina ou hipoglicemiantes orais, classificadas como metabolizadoras extensivas do metoprolol (CYP2D6) e com funções hepática e renal dentro dos limites da normalidade.

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central de Análises Clínicas do HCFMRP-USP. Foram realizadas as dosagens plasmáticas de uréia, creatinina, bilirrubinas, aspartato aminotransaminase (AST), alanina aminotransaminase (ALT), glicemia, proteínas totais, albumina, hemoglobina glicada, sódio e potássio.

A taxa de filtração glomerular avaliada pelo *clearance* de creatinina (CCr) foi estimada pela fórmula proposta por Cockcroft e Gaut (1976):

$$CCr = \frac{(140 - \text{idade}) \times (\text{peso}) \times 0,85}{72 \times \text{creatinina sérica}}$$

3.1.3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas as parturientes hipertensas com Diabetes *mellitus* gestacional descompensada, ou seja, com hemoglobina glicada acima de 6,5% (WHO, 1999), portadoras de insuficiência cardíaca congestiva, gestantes que sofreram infarto ou acidente vascular cerebral há menos de 06 meses, gestantes com insuficiência renal crônica e gestantes com história de doença pulmonar obstrutiva crônica grave. Também foram excluídas as parturientes hipertensas que fizeram uso de indutores ou inibidores do CYP.

3.2 Protocolo clínico

As parturientes hipertensas incluídas na investigação receberam dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (Lopressor®, Novartis, Brasil) com 20mL de água. As amostras de sangue materno (5mL) foram coletadas via cateter intravenoso em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000UI, Roche) nos tempos zero, 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16; 20 e 24 horas após a administração do metoprolol.

No momento do parto foram coletadas uma amostra de sangue materno e uma amostra do sangue do cordão umbilical para determinar a taxa de transferência

placentária do fármaco. Nas parturientes com resolução da gestação por via alta (n=18) também foram coletadas alíquotas de 5 ml de líquido amniótico para a determinação da distribuição do fármaco neste compartimento.

As alíquotas de plasma obtidas após a centrifugação do sangue (1800g durante 20 min) e as amostras de líquido amniótico foram armazenados a -70°C até o momento da análise.

3.3 Análise enantiosseletiva do metoprolol e seus metabólitos em plasma e em líquido amniótico

3.3.1 Soluções padrão e reagentes

As soluções estoque de metoprolol (tartarato de metoprolol 97%, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e α -hidroximetoprolol racêmicos (α -hidroximetoprolol, Toronto Research Chemicals Inc, North York, Canadá) foram preparadas na concentração de 0,2 mg da base livre/mL de metanol. A partir destas soluções foram realizadas diluições para a obtenção das soluções de uso, nas concentrações 0,016; 0,04; 0,08; 0,4; 2,0; 4,0; 8,0 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de metanol.

A solução estoque do ácido O-desmetilmetoprolóico racêmico (98%, Toronto Research Chemicals Inc, North York, Canadá) foi preparada na concentração de 220 $\mu\text{g/mL}$ de metanol. A partir desta solução foram feitas diluições para a obtenção das soluções de uso nas concentrações 0,44; 0,55; 1,1; 2,2; 4,4; 11; 22; 44 $\mu\text{g/mL}$ de metanol.

A solução de antipirina (padrão interno - PI, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de metanol e diluída para 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

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

A água utilizada durante o experimento para o preparo dos reagentes foi obtida em sistema de purificação Milli Q Plus (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.3.2 Análise dos isômeros do metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e em líquido amniótico

A separação dos enantiômeros do metoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol foi obtida na coluna Chiralpak[®] AD (Daicel Chemical Industries, New York, EUA), com partículas de 10 μ m (250 x 4,6 mm) protegida por uma pré-coluna CN (Lichospher[®] 100, 4x4 mm, Merck[®], Darmstadt, Alemanha) empregando a fase móvel (1,2 mL/min) hexano:etanol:isopropanol:dietilamina (88:10,2:1,8:0,2, v/v), conforme anteriormente descrito por Cerqueira et al., (1999) e Cerqueira et al., (2003b).

O sistema de detecção por espectrometria de massas (MS/MS) utilizado foi o Quattro Micro LC triplo quadrupolo (Micromass, Manchester, Reino Unido) equipado com uma interface de *electrospray* (ESI). As análises foram executadas no modo íon positivo. A voltagem do capilar no ESI foi de 3 KV. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 120 e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 400 L/h. O gás argônio foi utilizado como gás de colisão na pressão de aproximadamente $2,76 \times 10^{-3}$ mbar. A voltagem do cone foi mantida em 20 V para o metoprolol, 30 V para o α -hidroximetoprolol e em 25 V para o PI. A energia de colisão foi de 20 eV para o metoprolol, α -hidroximetoprolol e para o PI.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão (250 μ g/mL de metanol) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 20 μ L/min. As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos foram monitorados nas transições 268>116 para o metoprolol, 284>116 para o α -hidroximetoprolol e 189>104 para o PI. Foi utilizada como infusão pós-coluna uma solução composta de etanol: acetato de amônio aquoso 10 mM (95:5). A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.3.2.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 1000 μ L de plasma ou líquido amniótico foram alcalinizadas com 250 μ L da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M, adicionadas de 100 mg de

cloreto de sódio, e extraídas com 4 mL da solução diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v) durante 30 min em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min). As amostras foram centrifugadas a 1800 g durante 5 min e as fases orgânicas (3,5 mL) concentradas sob fluxo de ar. Os resíduos foram retomados em 150 μ L de fase móvel e 120 μ L foram submetidos à análise cromatográfica.

3.3.2.2 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das alturas dos picos do metoprolol, α -hidroximetoprolol e PI injetados diretamente na fase móvel, com as alturas dos picos do metoprolol, α -hidroximetoprolol e PI adicionados a extratos de plasma ou líquido amniótico branco (processo de extração descrito no item 3.3.2.1) oriundos de seis diferentes parturientes.

3.3.2.3 Curvas de calibração

As curvas de calibração para a análise dos enantiômeros do metoprolol e isômeros do α -hidroximetoprolol foram construídas após o enriquecimento de alíquotas de 1 mL de plasma ou líquido amniótico branco (obtidos de parturientes sem o uso do tartarato de metoprolol) com 25 μ L de cada solução padrão de uso. Assim, as concentrações plasmáticas e no líquido amniótico correspondem a 0,2; 0,5; 1; 5; 25; 50; 100; 125 e 250ng de cada enantiômero do metoprolol/mL e 0,1; 0,25; 0,5; 2,5; 12,5; 25; 50; 62,5 e 125 ng de cada isômero do α -hidroximetoprolol/mL.

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

3.3.2.4 Validação do método de análise dos enantiômeros do metoprolol e do α -hidroximetoprolol em plasma e em líquido amniótico

O método desenvolvido foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003) para métodos bioanalíticos.

3.3.2.4.1 Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração amostras enriquecidas com soluções padrão de metoprolol (0,5; 100 e 200 ng de cada enantiômero/mL de plasma ou líquido amniótico) e α -hidroximetoprolol (1,25; 50 e 100 ng de cada enantiômero/mL de plasma ou líquido amniótico) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.2.1. As concentrações de metoprolol, α -hidroximetoprolol e PI dessas amostras foram calculadas através da comparação direta com as alturas dos picos de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma ou fluido amniótico branco.

3.3.2.4.2 Linearidade e limite de quantificação

A linearidade foi avaliada com amostras de plasma e líquido amniótico enriquecidas com concentrações crescentes dos fármacos em relação àquelas empregadas na construção das curvas de calibração e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática ou no líquido amniótico que apresentou relação linear com a resposta do detector.

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração analisada com coeficiente de variação inferior a 20% e com porcentagem de inexatidão inferior a 15%. Assim, foram analisadas amostras de metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e em líquido amniótico em concentrações decrescentes àquelas empregadas na construção das curvas de calibração.

3.3.2.4.3 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. As soluções de metoprolol foram preparadas nas concentrações de 0,2; 100 e 200 ng de cada enantiômero/mL de plasma e líquido amniótico. A solução de α -hidroximetoprolol foi preparada nas concentrações de 0,1; 50 e 100 ng de cada enantiômero/mL de plasma e líquido amniótico. 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 5 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 5 alíquotas das soluções de metoprolol e α -hidroximetoprolol durante 5 diferentes corridas em 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 exatidão.

3.3.2.4.4 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta e longa duração. Para a avaliação da estabilidade do metoprolol foram preparadas amostras enriquecidas com concentrações baixa e alta (3 e 200 ng de cada enantiômero/mL de plasma e líquido amniótico), enquanto que para a avaliação do α -hidroximetoprolol foram preparadas amostras enriquecidas nas concentrações 1,5 e 100 ng de cada isômero/mL de plasma e líquido amniótico.

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 h, a seguir foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 5°C durante 24 h antes da injeção no sistema cromatográfico. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas de plasma e fluido amniótico foram mantidas na bancada do laboratório em temperatura ambiente durante 6 h. Para a avaliação da estabilidade de longa duração as amostras de plasma enriquecidas foram mantidas congeladas a -20°C por 12 meses.

Os resultados das estabilidades foram comparados com aqueles obtidos com as amostras recém-preparadas e foram expressos em porcentagem de desvio.

3.3.3 Análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e líquido amniótico

A análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma e líquido amniótico foi realizada conforme o procedimento desenvolvido e validado em estudo anterior do grupo (CERQUEIRA et al., 2003a).

Foi empregado um sistema cromatográfico constituído por bomba, auto-injetor operando a 5°C e detector por fluorescência operando em 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão). Para a separação dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregada a coluna Chiralcel® OD-R (Daicel Chemical Industries, New York, EUA), com partículas de 10 µm (250 x 4,6 mm) protegida por uma pré-coluna RP-18 (Nova-Pak®, Waters) operando a 25°C com fase móvel constituída por mistura de solução aquosa de perclorato de sódio 0,5M pH=3,0:acetonitrila (85:15) com fluxo de 0,4 mL/min.

3.3.3.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 400 µL de plasma ou líquido amniótico foram alcalinizadas com 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M e desproteinizadas com 3 mL de acetonitrila. Os tubos foram agitados em *vortex* por 30 segundos. Após centrifugação, 3 mL do sobrenadante foram transferidos para outros tubos contendo o mesmo volume da mistura diclorometano:éter di-isopropílico (1:1, v/v). Os tubos foram agitados por mais 1 min em *vortex* e centrifugados a 2500 g por 5 min. As fases aquosas adicionadas de 15 µL de ácido perclórico 0,225 M (100 µL) foram transferidas para os frascos do injetor automático e submetidas à análise cromatográfica (80 µL).

3.3.3.2. Validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma

As curvas de calibração dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma foram construídas com alíquotas de 400 µL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de uso. As concentrações correspondem a 17,1875; 34,375; 68,75; 137,5; 343,75; 687,5 e 1375,0 ng de cada enantiômero/mL.

O método descrito e validado por Cerqueira et al., 2003a relata limites de quantificação de 17 ng/mL de plasma para ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico, linearidade de 17-3300 ng/mL de plasma para ambos os enantiômeros e precisão e exatidão compatíveis com a aplicação do método em estudos de disposição cinética e metabolismo. O estudo de estabilidade realizado posteriormente por Boralli, 2006 relata que ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico são estáveis em plasma humano durante três ciclos de congelamento/descongelamento e durante 30 dias a -20°C .

3.3.3.3 Validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico

As curvas de calibração para a análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico foram construídas com a análise de alíquotas de 400 μL de líquido amniótico branco (líquido amniótico obtido de parturientes sem o uso do tartarato de metoprolol) enriquecidas com 25 μL de cada solução de uso. Assim, as concentrações no líquido amniótico correspondem a 13,75; 17,1875; 34,375; 68,75; 137,5; 343,75; 687,5 e 1375,0 ng de cada enantiômero/mL. Para a construção das curvas de calibração, as concentrações foram relacionadas no eixo x , e as razões de áreas dos picos no eixo y . Foram determinadas as equações de regressão linear e os coeficientes de correlação.

3.3.3.3.1 Linearidade e limite de quantificação

A linearidade do método analítico foi estudada com amostras de líquido amniótico enriquecidas com concentrações crescentes do fármaco em relação àquelas empregadas na construção das curvas de calibração e, a seguir, submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática que apresentou relação linear com a resposta do detector.

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração analisada com coeficiente de variação inferior a 20% e com porcentagem de inexatidão inferior a 15%. Assim, foram analisadas amostras de ácido O-desmetilmetoprolóico em

líquido amniótico em concentrações decrescentes àquelas empregadas na construção da curva de calibração.

3.3.3.3.2 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e interensaios. As soluções de ácido O-desmetilmetoprolóico foram preparadas nas concentrações de 41,4; 517,5 e 1035 ng de cada enantiômero/mL de líquido amniótico. 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 5 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 5 alíquotas das soluções de ácido O-desmetilmetoprolóico em 5 diferentes corridas durante 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 exatidão.

3.3.3.3.3 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento, estabilidade de curta e longa duração. Para a avaliação da estabilidade do ácido O-desmetilmetoprolóico foram preparadas amostras enriquecidas com concentrações baixa e alta (41,4 e 1035 ng de cada enantiômero do ácido O-desmetilmetoprolóico por mL de líquido amniótico). Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 h, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 5^oC por um período de 12 h, sendo, então injetadas no sistema cromatográfico. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as

amostras enriquecidas foram mantidas na bancada do laboratório em temperatura ambiente por 6 h. Para a avaliação da estabilidade de longa duração as amostras enriquecidas foram mantidas congeladas a -20°C por 3 meses.

Os resultados das estabilidades foram comparados com aqueles obtidos com as amostras recém-preparadas e foram expressos em porcentagem de desvio.

3.4 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol

A razão metabólica metoprolol/ α -hidroximetoprolol foi calculada dividindo a concentração do metoprolol pela concentração do α -hidroximetoprolol no plasma obtido 3h após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (FRANK et al., 2007). Os cálculos foram realizados com as misturas isoméricas das concentrações plasmáticas.

3.5 Análise farmacocinética

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o programa WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral do metoprolol foram analisados por metodologia não compartimental.

3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad InStat para obtenção da mediana, média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Para a avaliação das razões isoméricas diferentes da unidade para o metoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico foi empregado o teste de Wilcoxon bicaudal para dados pareados e para o α -hidroximetoprolol foi empregado o teste não paramétrico de comparações múltiplas Kruskal-Wallis. O teste Mann-Whitney bicaudado para dados não pareados foi utilizado para comparar os parâmetros farmacocinéticos entre os grupos controle e diabético. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

4.1 Características das pacientes investigadas

As parturientes investigadas (n=35) foram distribuídas em dois grupos, sendo um composto por parturientes hipertensas não portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (n=24) e outro por parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (n=11).

Os dados demográficos das pacientes investigadas estão apresentados na Tabela 1 como mediana e IC 95 % e no ANEXO 3 (Tabelas i e ii) como valores individuais. A idade das parturientes variou entre 21 a 45 anos, a idade gestacional de 35 a 42 semanas, o peso gestacional entre 58,5 a 145,8 Kg e o IMC gestacional entre 26 a 51,7 Kg/m².

Os dados demográficos não mostram diferenças com significância estatística (Teste de Mann-Whitney, p<0,05) entre os grupos de parturientes portadoras (HD) e não portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (H).

Tabela 1: Características das pacientes investigadas. Dados expressos como mediana (IC 95%)

Parâmetros	Grupos investigados	
	H (n=24)	HD (n=11)
Idade (anos)	29 (27,74-32,76)	33 (29,14-37,40)
Peso pré-gestacional (Kg)	88 (80,79-98,54)	92 (80,62-98,23)
Peso na resolução (Kg)	104,35 (94,44-111,02)	102,80 (93,16-106,26)
Altura (m)	1,62 (1,60-1,65)	1,61 (1,55-1,64)
IMC pré-gestacional (Kg/m ²)	33,53 (30,90-37,46)	33,58 (30,86-38,22)
IMC na resolução (Kg/m ²)	39,62 (36,24-41,33)	39,03 (36,66-41,87)
Idade gestacional (dias)	271 (267,54-278,12)	269 (267,43-282,93)
Fármacos associados	1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;12; 13;14;15;16;17;18;19;20; 21;22;23;24;25;26;27;28	1;2;3;4;5;6;8;10; 11; 14;15;16;17;18; 19;20;22;24; 28;29

Fármacos associados: 1-metildopa; 2-nifedipina; 3-hidralazina; 4-dipirona; 5-ocitocina; 6-cefazolina; 7-dimeticona; 8-sulfato ferroso; 9-metronidazol; 10-misoprostol; 11-cetoprofeno; 12- tiroxina; 13-betametazona; 15-furosemida; 16-ondansetrona;17-sufentanil;18-bupivacaína;19-efedrina; 20-ranitidina;21-nausedron;22-dexametasona;23-xilocaína;24-morfina;25-metoclopramida; 26-tramadol;27-diclofenaco sódico;28-dexclorferinamina;29- bromoprida.

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

As parturientes investigadas mostram parâmetros bioquímicos dentro dos limites da normalidade para as funções renal e hepática. Os parâmetros bioquímicos estão apresentados na Tabela 2 como mediana e IC 95% e no ANEXO 4 (Tabelas iii e iv) como valores individuais. As parturientes com o diagnóstico de Diabetes *mellitus* gestacional apresentaram valores de glicemia ($p < 0,05$) maiores do que aquelas diagnosticadas como não portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional.

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos das pacientes investigadas. Dados expressos como mediana (IC 95%)

Parâmetros Valores de Referência	Grupos investigados	
	H (n=24)	HD (n=11)
Uréia	15,50	20,50
10-50 mg/dL	(11,75-18,25)	(12,92-23,48)
Creatinina	0,60	0,75
0,7-1,5 mg/dL	(0,61-0,76)	(0,63-0,83)
Clearance de creatinina	183,00	175,50
75-115mL/min/1,73m ²	(177,60-246,12)	(152,10-209,35)
AST	16,00	16,50
Até 38 U/L	(14,17-17,20)	(12,5-23,15)
ALT	11,00	11,00
Até 31 U/L	(8,30-13,44)	(3,78-22,79)
Bilirrubina total	0,44	0,33
0,2-1,2 mg/dL	(0,39-0,75)	(0,24-0,46)
Bilirrubina direta	0,20	0,13*
0,0-0,3 mg/dL	(0,16-0,27)	(0,1-0,17)
Glicemia de jejum	78,00	91,00*
70-110 mg/dL	(67,95-86,21)	(78,64-99,16)
Glicemia 2h (TTOG 75)	—	130,5 (104,54-171,13)
Hemoglobina glicada < 6,5 %	—	5,30 (4,69-6,0)
Sódio	140,00	138,30
135-145 mmol/L	(138,34-140,93)	(137,35-140,23)
Potássio	4,05	4,20
3,5-5,0 mmol/L	(3,88-4,33)	(3,94-4,34)
Proteínas totais	5,85	5,90
6,0-8,5 g/dL	(5,44-6,36)	(5,58-6,16)
Albumina sangue	3,50	3,30
3,5-4,8 g/dL	(3,23-3,67)	(3,24-3,56)

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

Durante o período da investigação os parâmetros hemodinâmicos das parturientes hipertensas foram monitorados através do registro da pressão arterial sistólica e diastólica e da frequência cardíaca. Os dados obtidos mostraram estabilidade hemodinâmica. Os valores do registro 2h após a administração do fármaco estão expressos na Tabela 3 como mediana e IC 95%.

Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos das pacientes investigadas 2h após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Dados expressos como mediana (IC 95%)

Parâmetros	Grupos investigados	
	H	HD
Pressão arterial sistólica (mmHg)	133,0 (124,12-141,67)	120,0 (112,91-124,89)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	71,0 (66,95-83,36)	67,5 (51,97-78,63)
Frequência cardíaca (bpm)	78,0 (71,40-80,10)	74,5 (67,50-82,30)

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

Os recém-nascidos das parturientes hipertensas investigadas não apresentaram doenças ao nascer. Os valores de peso e altura ao nascer estão apresentados na Tabela 4 como mediana e IC 95 % . Os recém-nascidos das parturientes incluídas no grupo de Diabetes *mellitus* gestacional apresentaram valores de peso ($p < 0,05$) maiores do que aqueles das parturientes não portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional. Apenas cinco recém-nascidos do grupo de hipertensas e um do grupo de portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional apresentaram Índice de Apgar menor que 7 no primeiro minuto e todos apresentaram valores maiores que 7 no quinto minuto (ANEXO 5, Tabelas v e vi). Todos os recém-nascidos apresentaram evolução favorável no período pós-natal.

Tabela 4: Características dos recém-nascidos das pacientes investigadas. Dados expressos como mediana (IC 95%)

Parâmetros	Grupos investigados	
	H	HD
Peso (g)	3215,0 (3022,9-3525,3)	3635,0* (3320,8-3926,5)
Altura (cm)	49,0 (47,89-49,94)	50,0 (48,90-51,47)

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

4.2 Método

4.2.1 Análise enantiosseletiva do metoprolol e seus principais metabólitos

4.2.1.1 Análise enantiosseletiva do metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico

A análise dos enantiômeros do metoprolol e α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico foi realizada por LC-MS/MS.

A Figura 3 mostra os íons protonados $[M + H]^+$ e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 268>116 para o metoprolol e 284>116 para o α -hidroximetoprolol.

Os enantiômeros do metoprolol e α -hidroximetoprolol foram separados na coluna de fase quiral Chiralpak AD com fase móvel (1,2 mL/min) constituída por mistura de hexano:etanol:isopropanol:dietilamina (88:10,2:1,8:0,2,v/v). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.

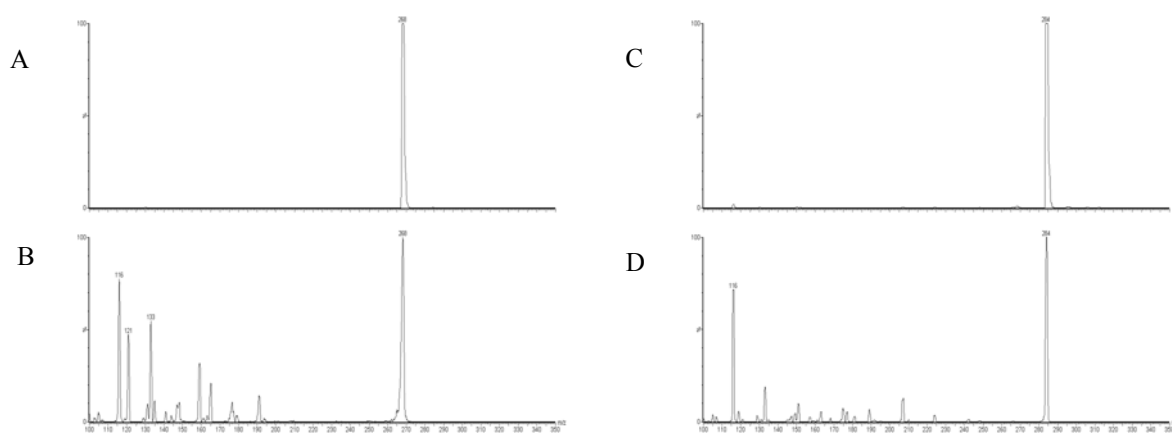


Figura 3: Espectro de massas do íon molecular protonado (A) e do íon produto (B) do metoprolol e do íon molecular protonado (C) e do íon produto (D) do α -hidroximetoprolol.

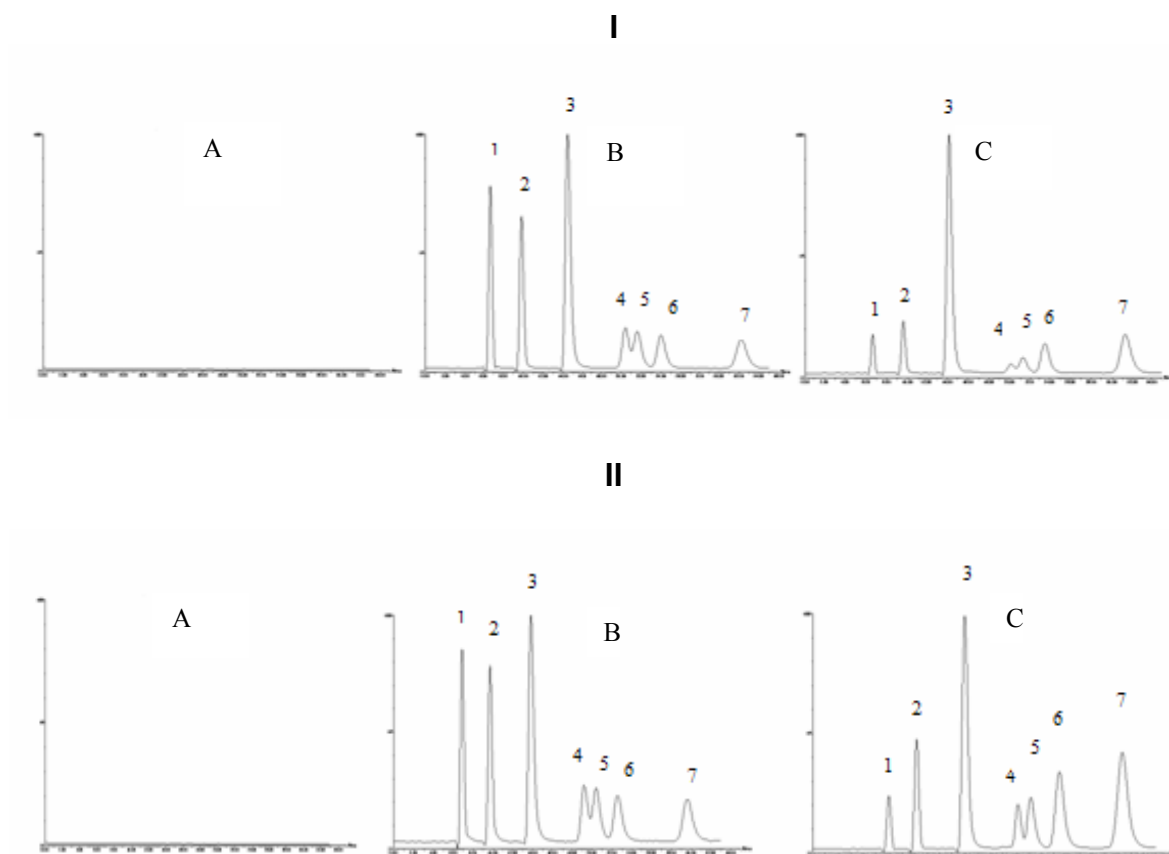


Figura 4 - Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α - hidroximetoprolol em plasma (I) e líquido amniótico (II). (A) Plasma ou líquido amniótico humano branco, (B) Plasma ou líquido amniótico humano enriquecido com metoprolol (25 ng de cada enantiômero/mL), α -hidroximetoprolol (12,5 ng de cada isômero/mL) e padrão interno, (C) Plasma de parturiente obtido 4h após a administração de dose única de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico ou líquido amniótico coletado no momento do parto. Picos: 1- R-(+)- metoprolol, 2- S-(-)- metoprolol, 3- padrão interno (antipirina), 4- 1'S2R- α -hidroximetoprolol, 5- 1'S2S- α -hidroximetoprolol, 6- 1'R2R- α -hidroximetoprolol, 7- 1'R2S- α - hidroximetoprolol.

Os dados apresentados nas Tabelas 5-8 indicam que o efeito matriz na análise dos enantiômeros do metoprolol, α -hidroximetoprolol e do padrão interno em plasma e líquido amniótico é praticamente ausente.

Tabela 5: Efeito matriz para os enantiômeros do metoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano.

Concentração (ng/mL)	Efeito Matriz (%)		
	R-(+) MET	S-(-) MET	PI
			98,9
0,2	103,6	108,2	
100	105,2	108,0	
200	103,5	103,5	

Tabela 6: Efeito matriz para os isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de plasma humano

Concentração (ng/mL)	Efeito Matriz (%)				
	1'S,2R	1'S,2S	1'R,2R	1'R,2S	PI
					98,9
0,1	99,2	104,0	102,5	98,8	
50	98,3	96,9	110,2	109,8	
100	97,2	90,7	93,9	90,7	

Tabela 7: Efeito matriz para os enantiômeros do metoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de líquido amniótico

Concentração (ng/mL)	Efeito Matriz (%)		
	R-(+) MET	S-(-) MET	PI
			98,4
0,2	88,6	91,6	
100	89,1	89,2	
200	87,9	94,8	

Tabela 8: Efeito matriz para os isômeros do α -hidroximetoprolol e padrão interno (PI) em seis diferentes lotes de líquido amniótico

Concentração (ng/mL)	Efeito Matriz (%)				PI
	1'S,2R	1'S,2S	1'R,2R	1'R,2S	
	OHM				98,4
0,1	89,3	91,9	95,5	98,8	
50	95,0	89,4	91,7	93,3	
100	91,1	91,9	91,8	89,0	

Os parâmetros obtidos na validação dos métodos de análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico estão apresentados nas Tabelas 9 - 14. Os métodos apresentaram limite de quantificação, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do metoprolol administrado em regime de dose única.

Tabela 9 – Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) em plasma

	R-(+)-MET	S-(-)-MET
Recuperação absoluta (%)		
0,50 ng/mL	98,8	100,13
100 ng/mL	99,7	94,8
200 ng/mL	97,8	96,0
Linearidade (ng/mL)		
	0,2-250	0,2-250
Equação da reta	$y=0,0359x-0,00001$	$y=0,0291x+0,0011$
r	0,997	0,999
Limite de Quantificação (ng/mL)		
	0,2	0,2
Precisão (CV %, n = 8)		
Precisão (CV %, n = 8)	6,5	9,4
Exatidão (Inexatidão %)	5,6	-0,9
Precisão interensaios (CV %)		
0,6 ng/mL (n = 5)	9,1	8,2
100 ng/mL (n = 5)	6,5	7,4
200 ng/mL (n = 5)	7,5	7,3
Precisão intra-ensaio (CV %)		
0,6 ng/mL (n = 5)	1,9	4,9
100 ng/mL (n = 5)	1,7	3,8
200 ng/mL (n = 5)	4,6	8,8
Exatidão interensaios (Inexatidão %)		
3 ng/mL (n = 5)	0,5	1,9
100 ng/mL (n = 5)	-2,6	-3,0
200 ng/mL (n = 5)	-1,2	-2,1
Exatidão intra-ensaio (Inexatidão %)		
3 ng/mL (n = 10)	4,1	1,4
100 ng/mL (n = 10)	3,8	6,8
200 ng/mL (n = 10)	-3,2	-0,4

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$; r=coeficiente de correlação linear;
 % Inexatidão= $[(C_{\text{obs}}-C_{\text{adicionada}})/C_{\text{adicionada}}] \times 100$

Tabela 10 – Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em plasma

	1'S,2R OHM	1'S,2S OHM	1'R,2R OHM	1'R,2S OHM
Recuperação absoluta				
(%)				
0,25 ng/mL	97,4	98,5	99,3	98,7
50 ng/mL	98,9	99,9	98,7	98,8
100 ng/mL	101,3	100,2	99,5	96,6
Linearidade (ng/mL)				
Equação da reta	0,1 – 125 $y = 0,0156x - 0,00007$	0,1 – 125 $y = 0,0146x - 0,0001$	0,1 – 125 $y = 0,0135x - 0,0003$	0,1 – 125 $y = 0,0147x + 0,0004$
r	0,999	0,999	0,999	0,999
Limite de Quantificação				
(ng/mL)				
Precisão (CV %, n = 5)	8,5	5,3	7,5	11,2
Exatidão (Inexatidão %)	9,2	11,1	-2,2	2,5
Precisão interensaios				
(CV %)				
0,3 ng/mL (n=5)	7,3	9,9	6,6	7,5
50 ng/mL (n=5)	6,4	7,0	5,5	7,7
100 ng/mL (n=5)	5,0	6,7	6,5	6,5
Precisão intra-ensaio				
(CV %)				
0,3 ng/mL (n=5)	7,9	4,8	4,3	6,2
50 ng/mL (n=5)	7,6	3,9	2,8	6,5
100 ng/mL (n=5)	4,8	6,2	8,1	8,1
Exatidão interensaios				
(Inexatidão %)				
0,3 ng/mL (n=5)	2,8	-1,7	2,0	2,3
50 ng/mL (n=5)	1,1	-0,2	0,9	-0,1
100 ng/mL (n=5)	1,1	-2,0	0,1	-1,1
Exatidão intra-ensaio				
(Inexatidão %)				
0,3 ng/mL (n=5)	6,1	5,9	3,8	5,9
50 ng/mL (n=5)	3,4	8,0	5,1	8,2
100 ng/mL (n=5)	5,4	2,0	-1,4	-0,8

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100]; r=coeficiente de correlação linear;
% Inexatidão= [(C_{obs}-C_{adicionada})/C_{adicionada}] \times 100

Tabela 11 – Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) e dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em plasma

Concentração	Curta duração (4 h)	Congelamento/ descongelamento (3 ciclos)	Pós processamento (24h)	Longa duração (12 meses)
Desvio (%)				
MET				
(3 ng/mL)				
R-(+)MET	3,3	-1,4	-5,6	2,6
S-(-)MET	1,8	3,4	2,9	12,1
(200 ng/mL)				
R-(+)MET	3,4	0,1	-0,4	5,7
S-(-)MET	-2,1	-5	-7,3	11,5
α-OHM				
(1,5 ng/mL)				
1'S,2R	1,4	0,9	-6,8	11,4
1'S,2S	10,6	1,6	4,1	12,4
1'R,2R	3,9	2,5	6,4	8,7
1'R,2S	-6,8	-2,3	-6,7	3,8
(100 ng/mL)				
1'S,2R	-6,9	-10,2	-2,8	4
1'S,2S	-10,8	-3,9	-1,8	2,7
1'R,2R	0,3	-2,2	1,8	9,8
1'R,2S	1,1	1,2	-4,4	4,7

% desvio em relação às amostras recém-preparadas

Tabela 12- Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) em líquido amniótico

	R-(+)-MET	S-(-)-MET
Recuperação absoluta (%)		
0,50 ng/mL	108,7	105,3
100 ng/mL	98,3	99,4
200 ng/mL	100,8	99,0
Linearidade (ng/mL)		
	0,2-250	0,2-250
Equação da reta	$y=0,0268x+0,0051$	$y=0,0241x+0,00128$
r	0,995	0,998
Limite de Quantificação (ng/mL)		
	0,2	0,2
Precisão interensaios (CV %)		
0,6 ng/mL (n = 5)	8,4	8,5
100 ng/mL (n = 5)	6,1	7,1
200 ng/mL (n = 5)	7,0	5,7
Precisão intra-ensaio (CV %)		
0,6 ng/mL (n = 5)	9,1	6,5
100 ng/mL (n = 5)	5,3	5,0
200 ng/mL (n = 5)	5,0	3,8
Exatidão interensaios (Inexatidão %)		
3 ng/mL (n = 5)	-2,5	-0,1
100 ng/mL (n = 5)	-9,4	-6,8
200 ng/mL (n = 5)	-0,8	1,1
Exatidão intra-ensaio (Inexatidão %)		
3 ng/mL (n = 10)	-7,2	-6,7
100 ng/mL (n = 10)	-12,3	-10,9
200 ng/mL (n = 10)	2,4	1,7

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100]; r=coeficiente de correlação linear.
 % Inexatidão= [(C_{obs}-C_{adicionada})/C_{adicionada}]x 100.

Tabela 13- Limites de confiança do método de análise dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em líquido amniótico

	1'S,2R	1'S,2S	1'R,2R	1'R,2S
	OHM	OHM	OHM	OHM
Recuperação absoluta				
(%)				
0,25 ng/mL	100,7	109,7	100,6	101,9
50 ng/mL	94,2	89,9	90,5	99,0
100 ng/mL	89,2	90,9	92,2	92,0
Linearidade (ng/mL)				
Equação da reta	0,1 – 125 $y = 0,0107x + 0,0010$	0,1 – 125 $y = 0,0104x - 0,00004$	0,1 – 125 $y = 0,0085x + 0,0004$	0,1 – 125 $y = 0,0100x - 0,0004$
r	0,998	0,997	0,995	0,999
Limite de Quantificação				
(ng/mL)				
Precisão (CV %, n = 10)	8,5	6,4	13,4	9,2
Exatidão (Inexatidão %)	1,04	-3,9	1,7	-8,5
Precisão interensaios				
(CV %)				
0,3 ng/mL (n=5)	5,7	6,9	6,9	6,8
50 ng/mL (n=5)	8,0	6,6	7,9	8,5
100 ng/mL (n=5)	5,7	8,4	7,3	7,1
Precisão intra-ensaio				
(CV %)				
0,3 ng/mL (n=5)	3,8	3,0	4,9	9,2
50 ng/mL (n=5)	3,3	4,1	7,6	4,2
100 ng/mL (n=5)	4,4	4,9	5,4	7,9
Exatidão interensaios				
(Inexatidão %)				
0,3 ng/mL (n=5)	2,6	-1,4	-1,7	-2,1
50 ng/mL (n=5)	-4,2	-6,3	0,4	-3,1
100 ng/mL (n=5)	1,2	-5,1	0,1	-2,5
Exatidão intra-ensaio				
(Inexatidão %)				
0,3 ng/mL (n=5)	5,8	3,9	-4,2	-9,4
50 ng/mL (n=5)	-7,0	-8,6	-1,1	6,9
100 ng/mL (n=5)	-4,5	-8,5	0,7	2,6

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$; r=coeficiente de correlação linear.

% Inexatidão = $[(C_{\text{obs}} - C_{\text{adicionada}}) / C_{\text{adicionada}}] \times 100$.

Tabela 14– Estudo da estabilidade do método de análise dos enantiômeros do metoprolol (MET) e dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em líquido amniótico

Concentração	Curta duração (4 h)	Congelamento/ descongelamento (3 ciclos)	Pós processamento (24h)	Desvio (%)
MET				
(3 ng/mL)				
R-(+)MET	3,3	-1,4	-5,6	
S_(-)MET	1,8	3,4	2,9	
(200 ng/mL)				
R-(+)MET	3,4	0,1	-0,4	
S_(-)MET	-2,1	-5	-7,3	
α-OHM				
(1,5 ng/mL)				
1'S,2R	1,4	0,9	-6,8	
1'S,2S	10,6	1,6	4,1	
1'R,2R	3,9	2,5	6,4	
1'R,2S	-6,8	-2,3	-6,7	
(100 ng/mL)				
1'S,2R	-6,9	-10,2	-2,8	
1'S,2S	-10,8	-3,9	-1,8	
1'R,2R	0,3	-2,2	1,8	
1'R,2S	1,1	1,2	-4,4	

% desvio em relação às amostras recém preparadas

4.2.1.2 Análise enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico

Os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico foram separados na coluna Chiralcel[®] OD-R com fase móvel constituída por tampão perclorato 0,5 M pH=3,1: acetonitrila (85:15). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 5.

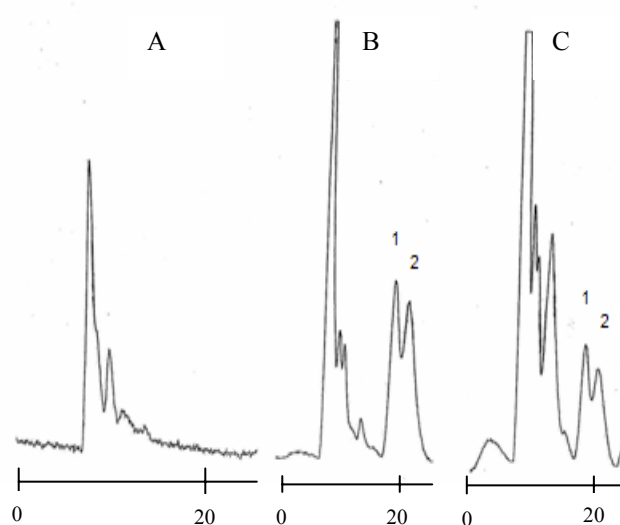


Figura 5 - Cromatogramas referentes à análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico. (A) Branco; (B) Líquido amniótico enriquecido com ácido O-desmetilmetoprolóico (690 ng/ml de cada enantiômero); (C) Líquido amniótico coletado no momento do parto e após a administração de dose única de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. 1- R-(+) AODM, 2- S-(-) AODM.

Os parâmetros obtidos na validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico estão apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15- Parâmetros de validação do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em líquido amniótico.

	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
Linearidade (ng/mL)	13,75-1375	13,75-1375
Equação da reta	$y=0,0068x+0,0798$	$y=0,0058x+0,02$
r	0,994	0,995
Limite de Quantificação (ng/mL)	13,75	13,75
Precisão (CV %, n = 5)	8,9	13,6
Exatidão (Inexatidão %)	-1,7	-6,7
Precisão interensaios (CV %)		
41,4ng/mL (n = 5)	9,8	10,2
517,5 ng/mL (n = 5)	6,1	8,9
1035 ng/mL (n = 5)	6,0	6,0
Precisão intra-ensaio (CV %)		
41,4ng/mL (n = 5)	7,4	8,1
517,5 ng/mL (n = 5)	6,5	6,0
1035 ng/mL (n = 5)	3,6	5,0
Exatidão interensaios (Inexatidão %)		
41,4ng/mL (n = 5)	-2,9	-5,0
517,5 ng/mL (n = 5)	-10,0	-7,9
1035 ng/mL (n = 5)	-14,5	-10,1
Exatidão intra-ensaio (Inexatidão %)		
41,4ng/mL (n = 5)	-0,8	-1,5
517,5 ng/mL (n = 5)	-14,6	-9,5
1035 ng/mL (n = 5)	-13,1	-11,7

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$; r=coeficiente de correlação linear.
 % Inexatidão= $[(C_{\text{obs}}-C_{\text{adicionada}})/C_{\text{adicionada}}] \times 100$.

Tabela 16– Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em líquido amniótico.

Concentração	Curta duração (4 h)	congelamento/ descongelamento (3 ciclos)	Pós processamento (24h)	Longa duração (3 meses)
Desvio (%)				
AODM				
(41,4 ng/mL)				
R-(+)AODM	3,45	9,91	1,72	0,62
S-(-)AODM	-3,09	5,72	-3,66	13,84
(1035 ng/mL)				
R-(+)AODM	-3,72	3,07	-1,85	-1,87
S-(-)AODM	1,5	8,58	2,07	11,25

% desvio em relação às amostras recém-preparadas

4.3 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol (CYP2D6)

As razões metabólicas de concentrações plasmáticas como misturas isoméricas metoprolol/ α -hidroximetoprolol obtidas 3h após a administração do fármaco marcador estão apresentadas na Tabela 17 para as parturientes dos grupos H e HD. Todas as parturientes foram fenotipadas como metabolizador extensivo (EM) com base nas razões metabólicas inferiores a 12,6 (SOHN et al., 1992).

Tabela 17: Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=25)

	MET/OHM	Fenótipo
Grupo H		
1	4,81	EM
2	0,88	EM
3	1,06	EM
4	1,22	EM
5	6,67	EM
6	0,58	EM
7	0,34	EM
8	0,30	EM
9	0,24	EM
10	0,52	EM
11	0,86	EM
12	0,17	EM
13	0,36	EM
Grupo HD		
1	1,39	EM
2	6,03	EM
3	0,12	EM
4	0,27	EM
5	0,85	EM
6	1,34	EM
7	0,35	EM
8	1,40	EM
9	0,16	EM
10	0,56	EM

MET/OHM: metoprolol/ α -hidroximetoprolol; EM =metabolizador extensivo.

4.4 Disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas incluídas no grupo controle (Grupo H)

A disposição cinética dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em plasma foram avaliados em parturientes hipertensas incluídas no grupo controle (Grupo H, n=13). As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 6 e os parâmetros farmacocinéticos expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% estão apresentados nas Tabelas 18-20. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados no ANEXO 6 (Tabelas vii-xiv).

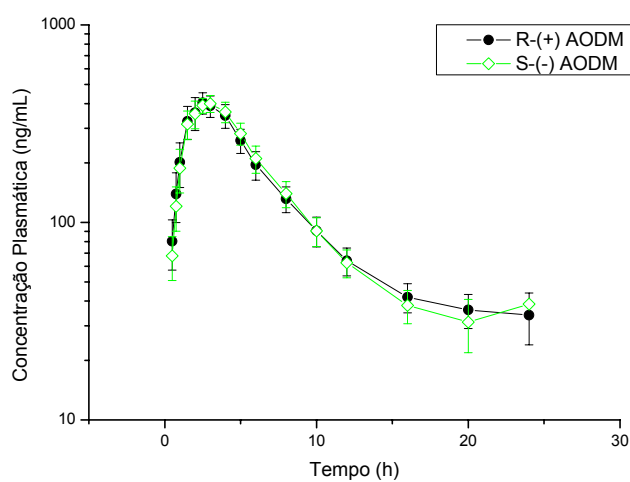
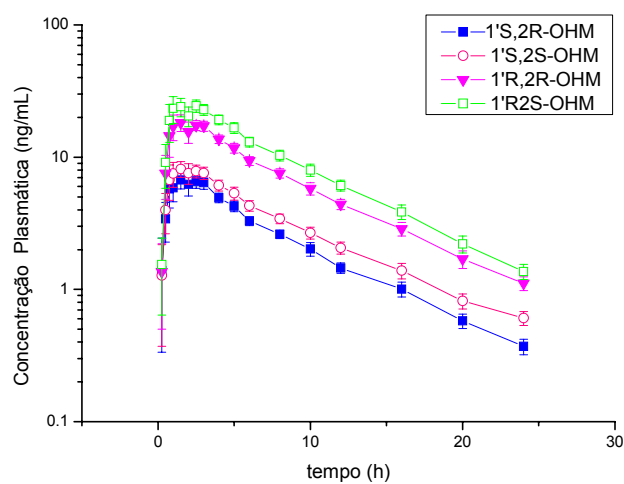
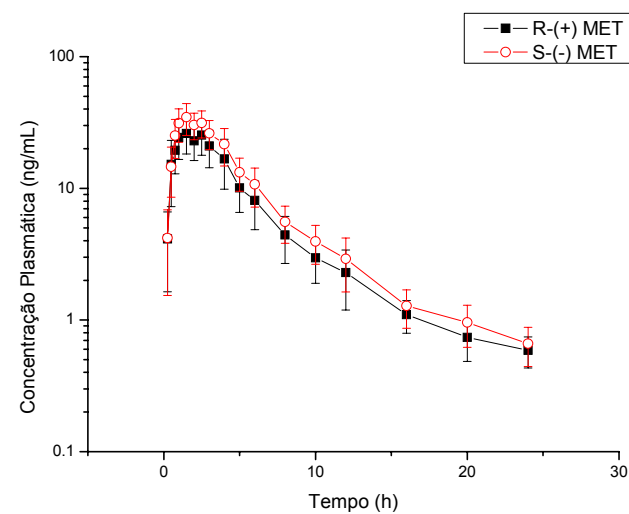


Figura 6 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III) em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13). Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

Tabela 18: Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
C_{max} (ng/mL)	22,89 42,41(20,56-64,26)	41,42* 48,84(30,16-67,51)
t_{max} (h)	1,50 1,65(1,16-2,15)	1,50 1,67(1,19-2,15)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	62,65 141,71(58,39-225,03)	113,42* 178,16(89,73-266,58)
MRT (h)	6,71 7,89(5,65-10,14)	5,87* 6,57(4,85-8,28)
$t_{1/2}$ (h)	7,74 8,81(6,38-11,24)	7,01 7,51(5,26-9,77)
Kel (h^{-1})	0,09 0,10(0,06-0,13)	0,10 0,11(0,08-0,15)
Vd/f (L/Kg)	56,73 78,66(34,74-122,58)	26,87* 42,01(21,03-62,98)
Cl/f (L/h/Kg)	5,29 5,33(3,19-7,48)	3,19* 3,62(2,29-4,95)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$		1,44 1,41(1,25-1,57)

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

Tabela 19. Disposição cinética dos isômeros do α -hidroximetoprolol em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
C_{max} (ng/mL)	9,64#♦	11,31♣⊗	26,14	33,68
	9,35 (7,34-11,35)	10,96 (8,41-13,52)	24,87 (19,50-30,24)	32,73 (25,08-40,39)
t_{max} (h)	2,00	2,00	2,00	2,00
	1,81 (1,24-2,37)	1,88 (1,25-2,52)	1,85 (1,21-2,49)	1,88 (1,27-2,50)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	57,37#♦	79,76♣⊗	168,52	223,99
	57,38 (48,37-66,38)	74,44 (60,48-88,39)	160,32 (136,69-183,94)	216,90 (179,47-254,32)
MRT (h)	8,54	9,03	8,75	8,49
	8,64 (7,46-9,82)	9,37 (8,16-10,58)	8,81 (7,89-9,72)	8,54 (7,74-9,34)
$t_{1/2}$ (h)	5,87	6,31	6,48	5,95
	6,22 (4,95-7,50)	6,50 (5,50-7,50)	6,05 (5,32-6,77)	5,86 (5,16-6,55)
Kel (h^{-1})	0,11	0,11	0,11	0,12
	0,12 (0,10-0,15)	0,11 (0,10-0,13)	0,11 (0,10-0,13)	0,12 (0,11-0,13)
$AUC^{0-\infty}$ 1'S,2R/ 1'S,2S		0,79		
		0,80(0,62-1,10)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R,2R/ 1'R,2S		0,70		
		0,76(0,69-0,83)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S		2,84		
		2,88(2,76-3,01)		
$AUC^{0-\infty}$ 2S/2R		0,75		
		0,77(0,70-0,83)		

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

1'S,2R versus 1'R,2R; ♣ 1'S,2S versus 1'R,2R; ♦ 1'S,2R versus 1'R,2S; ⊗ 1'S,2S versus 1'R,2S.

Tabela 20: Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em parturientes hipertensas do grupo controle (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=13). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
C_{max} (ng/mL)	523,63 520,70(430,52-610,87)	505,84* 483,74(402,84-564,65)
t_{max} (h)	2,00 2,54(1,95-3,12)	2,00 2,50(1,90-3,10)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	2769,70 3112,10(2429,10-3795,20)	2660,40* 2847,90(2213,30-3482,40)
MRT (h)	6,96 7,28(5,69-8,87)	6,90 6,52(5,39-7,65)
$t_{1/2}$ (h)	4,59 4,93(3,35-6,52)	3,62 3,78(2,95-4,62)
K_{el} (h ⁻¹)	0,15 0,17(0,12-0,21)	0,18 0,19(0,15-0,23)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$		0,93 0,92(0,86-0,98)

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

4.5 Disposição cinética e metabolismo enantiosseletivos do metoprolol e seus metabólitos em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes mellitus gestacional (Grupo HD)

A disposição cinética dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos em plasma foram avaliados em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD, n=10). As curvas médias de concentração plasmática *versus* tempo estão apresentadas na Figura 7 e os parâmetros farmacocinéticos expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95% estão apresentados nas Tabelas 21-23. Os parâmetros farmacocinéticos individuais estão apresentados no ANEXO 7 (Tabelas xv-xxii).

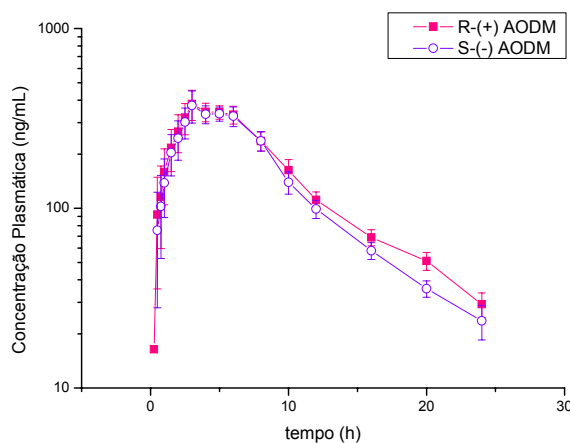
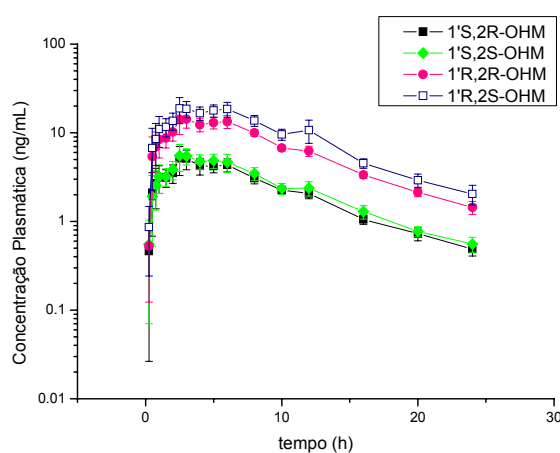
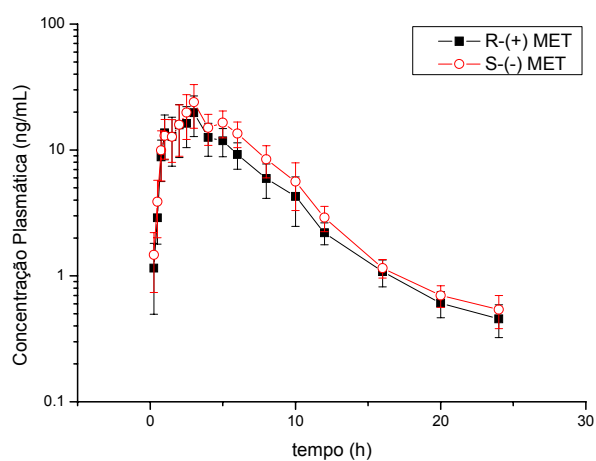


Figura 7 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do metoprolol (I), dos isômeros do α -hidroximetoprolol (II) e dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (III) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10). Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

Tabela 21 - Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	R-(+)-MET	S-(-)-MET
C_{max} (ng/mL)	18,98	22,90
	27,33(12,53-42,14)	31,26(12,97-49,54)
t_{max} (h)	2,50	2,75
	2,75(1,55-3,94)	3,15(1,94-4,35)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	84,63	125,32*
	119,20(41,48-196,92)	150,76(62,81-238,70)
MRT (h)	6,54	6,37
	6,39(4,78-8,00)	6,84(4,66-9,01)
$t_{1/2}$ (h)	3,57	4,38
	4,99(2,60-7,38)	5,10(3,08-7,13)
Kel (h ⁻¹)	0,19	0,16
	0,19(0,12-0,26)	0,17(0,11-0,24)
Vd/f (L/Kg)	25,60	20,18*
	41,07(15,95-66,19)	27,28(14,58-39,98)
Cl/f (L/h/Kg)	4,85	3,05*
	7,29(1,97-12,62)	4,78(1,88-7,68)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$		1,76
		1,57(1,19-1,94)

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

Tabela 22: Disposição cinética dos isômeros do α -hidroximetoprolol em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
C_{max} (ng/mL)	6,48#♦	7,25♣⊗	18,56	28,45
	7,97	8,66	22,99	31,06
	(4,42-11,51)	(4,93-12,39)	(14,93-31,05)	(19,62-42,51)
t_{max} (h)	3,00	2,75	3,00	3,00
	3,67	3,15	3,70	3,65
	(2,30-5,04)	(1,92-4,38)	(2,36-5,04)	(2,25-5,05)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	54,29#♦	59,84♣⊗	171,37	248,09
	57,38	74,44	160,32	216,90
	(42,16-71,49)	(46,26-81,79)	(140,63-202,29)	(175,26-316,34)
MRT (h)	8,54	9,03	8,75	8,49
	8,64	9,37	8,81	8,54
	(7,46-9,82)	(8,16-10,58)	(7,89-9,72)	(7,74-9,34)
$t_{1/2}$ (h)	5,36	6,20	5,35	5,74
	6,32	6,65	6,14	6,12
	(4,09-8,56)	(4,82-8,47)	(4,72-7,57)	(4,11-8,13)
Kel (h^{-1})	0,13	0,11	0,12	0,12
	0,13	0,12	0,12	0,13
	(0,10-0,15)	(0,10-0,15)	(0,10-0,15)	(0,11-0,17)
$AUC^{0-\infty}$ 1'S,2R/ 1'S,2S		0,90		
		0,92(0,72-1,13)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R,2R / 1'R,2S		0,73		
		0,74(0,64-0,85)		
$AUC^{0-\infty}$ 1'R/1'S		3,27		
		3,54(3,02-4,06)		
$AUC^{0-\infty}$ 2S/2R		0,79		
		0,77(0,67-0,87)		

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

1'S,2R versus 1'R,2R; ♣ 1'S,2S versus 1'R,2R; ♦ 1'S,2R versus 1'R,2S; ⊗ 1'S,2S versus 1'R,2S.

Tabela 23: Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=10). Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

Parâmetro	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
C_{max} (ng/mL)	456,86 512,70(384,48-640,91)	459,96 501,48(367,73-635,23)
t_{max} (h)	3,50 4,00(2,83-5,17)	3,00 3,80(2,64-4,96)
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	3675,90 3989,90(3375,00-4604,80)	3414,90* 3599,30(3018,40-4180,10)
MRT (h)	10,26 9,83(8,37-11,29)	8,70* 8,65(7,79-9,51)
$t_{1/2}$ (h)	5,85 6,50(5,10-7,89)	5,42 5,45(4,93-5,98)
Kel (h ⁻¹)	0,12 0,11(0,09-0,14)	0,13 0,13(0,11-0,14)
$AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$		0,91 0,90(0,83-0,98)

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

As Tabelas 24-26 mostram a comparação entre os Grupos H e HD na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os parâmetros farmacocinéticos estão expressos como mediana.

Tabela 24- Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10). Dados expressos como mediana.

Parâmetro	R(+)-MET		S(-)-MET	
	H	HD	H	HD
C _{max} (ng/mL)	22,89	18,98	41,42	22,90
t _{max} (h)	1,50	2,50*	1,50	2,75*
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	62,65	84,63	113,42	125,32
MRT (h)	6,71	6,54	5,87	6,37
t _{1/2} (h)	7,74	3,57*	7,01	4,38
Kel (h ⁻¹)	0,09	0,19*	0,10	0,16
Vd/f (L/kg)	56,73	25,60	26,87	20,02
Cl/f (L/h/Kg)	5,29	4,85	3,19	3,05

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

Tabela 25- Disposição cinética estereosseletiva do α-hidroxi metoprolol (OHM) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10). Dados expressos como mediana.

Parâmetro	1'S,2R-OHM		1'S,2S-OHM		1'R,2R-OHM		1'R,2S-OHM	
	H	HD	H	HD	H	HD	H	HD
C _{max} (ng/mL)	9,64	6,48	11,31	7,25	26,14	18,56	33,68	28,45
t _{max} (h)	2,00	3,00*	2,00	2,75*	2,00	3,00*	2,00	3,00*
AUC ^{0-∞} (ng.h/mL)	57,27	54,29	79,76	59,84	168,52	171,37	223,99	248,09
MRT (h)	8,54	9,21	9,03	9,40	8,75	9,48	8,49	9,77
t _{1/2} (h)	5,87	5,36	6,31	6,20	6,48	5,53	5,95	5,74
Kel (h ⁻¹)	0,11	0,13	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12

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

Tabela 26- Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) nos Grupos H (n=13) e HD (n=10). Dados expressos como mediana.

Parâmetro	R-(+)-AODM		S-(-)-AODM	
	H	HD	H	HD
C_{\max} (ng/mL)	523,63	456,86	505,34	459,96
t_{\max} (h)	2,00	3,50*	2,00	3,00*
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h/mL)	2769,70	3678,80*	2660,40	3414,90*
MRT (h)	6,96	10,26*	6,90	8,70*
$t_{1/2}$ (h)	4,59	5,85*	3,62	5,42*
K_{el} (h ⁻¹)	0,15	0,12	0,18	0,13*

* Teste Mann-Whitney, $p < 0,05$

4.6 Distribuição transplacentária e no líquido amniótico dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos.

Os valores expressos nas Tabelas 27-29 representam as concentrações dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos nas amostras de plasma materno, líquido amniótico e cordão umbilical coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H). Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%. Os valores individuais dos metabólitos estão apresentados no ANEXO 8 (Tabelas xxiii-xxx).

Tabela 27- Concentrações dos enantiômeros do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	R-(+)-MET	S-(-)-MET
Plasma materno (ng/mL)	12,22	17,09*
(n=20)	14,76(7,13-22,40)	19,78(11,47-28,09)
Cordão umbilical (ng/mL)	12,52	19,24*
(n=20)	16,54(6,69-26,40)	23,55(12,57-34,56)
Cordão umbilical/ plasma materno	1,04	1,15
(n=20)	1,31(0,91-1,70)	1,24(1,06-1,41)
Líquido amniótico (ng/mL)	24,48	44,72*
(n=12)	37,63(11,50-63,77)	51,13(22,47-79,80)
Líquido amniótico/ plasma materno	2,99	3,23
(n=12)	4,49(2,09-6,89)	4,62(2,27-6,96)

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

Tabela 28- Concentrações dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
Plasma materno (ng/mL) (n=22)	2,22#♦ 3,52 (2,16-4,87)	2,73♣⊗ 4,11 (2,75-5,48)	9,28 9,91 (7,10-12,72)	12,27 13,66 (9,80-17,52)
Cordão umbilical (ng/mL) (n=22)	3,00#♦ 3,60 (2,46-4,75)	3,52♣⊗ 4,33 (3,04-5,63)	7,81 9,25 (6,72-11,79)	11,37 12,24 (8,87-15,62)
Cordão umbilical/ plasma materno (n=22)	1,10 1,26 (1,01-1,51)	1,09 1,20 (1,00-1,39)	0,95 1,09 (0,83-1,28)	0,92 1,05 (0,83-1,28)
Líquido amniótico (ng/mL) (n=13)	5,14 7,04 (2,86-11,22)	5,75 7,55 (2,89-12,22)	10,10 17,41 (6,62-28,19)	14,33 19,17 (7,70-30,64)
Líquido amniótico/ plasma materno (n=13)	5,06 6,15 (2,28-10,02)	3,95 5,66 (1,74-9,58)	1,63 6,12 (0,34-11,90)	1,45 1,77 (0,25-9,30)

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

1'S,2R versus 1'R,2R; ♦ 1'S,2R versus 1'R,2S; ♣ 1'S,2S versus 1'R,2R; ⊗ 1'S,2S versus 1'R,2S.

Tabela 29- Concentrações dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
Plasma materno (ng/mL) (n=22)	330,44 323,97(251,17-396,78)	325,70 318,11(250,24-385,98)
Cordão umbilical (ng/mL) (n=22)	238,34 240,12(195,57-284,68)	238,15 230,89(185,84-275,94)
Cordão umbilical/ plasma materno (n=22)	0,82 0,83(0,70-0,95)	0,83 0,80(0,67-0,93)
Líquido amniótico (ng/mL) (n=13)	81,75 113,88(56,15-171,60)	79,61 124,47(58,94-190,00)
Líquido amniótico/ plasma materno (n=13)	0,29 1,09(-0,32-2,50)	0,37 1,33(-0,55-3,22)

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

Os valores expressos nas Tabelas 30-32 representam as concentrações dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos nas amostras de plasma materno, líquido amniótico e cordão umbilical coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD). Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%. Os valores individuais dos metabólitos estão apresentados no ANEXO 9 (Tabelas xxxi-xxxviii).

Tabela 30- Concentrações dos enantiômeros do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	R-(+)-MET	S-(-)-MET
plasma materno (ng/mL)	8,57	13,03*
(n=10)	12,44(3,87-21,00)	19,15(7,23-31,06)
cordão umbilical (ng/mL)	3,62	6,93*
(n=10)	9,75(1,54-17,97)	13,97(4,60-23,35)
cordão umbilical/ plasma materno	1,06	1,08
(n=10)	1,02(0,63-1,42)	0,98(0,64-1,32)
Líquido amniótico (ng/mL)	1,75	4,34
(n=5)	2,70(-1,64-7,03)	5,99(-1,64-13,61)
Líquido amniótico/ plasma materno	0,40	0,51
(n=5)	0,76(-0,66-2,18)	0,87(-0,39-2,12)

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

Tabela 31- Concentrações dos isômeros do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	1'S,2R-OHM	1'S,2S-OHM	1'R,2R-OHM	1'R,2S-OHM
Plasma materno (ng/mL) (n=10)	4,08▲# 5,23 (2,21-8,26)	4,48♣ 6,39 (2,12-10,65)	10,16■ 10,85 (7,10-14,59)	12,86 15,25 (9,44-21,06)
Cordão umbilical (ng/mL) (n=10)	2,14▲# 3,50 (0,53-6,46)	2,83♣⊗ 4,42 (0,30-8,54)	5,53■ 6,21 (3,85-8,57)	6,46 8,48 (5,08-11,88)
cordão umbilical/ plasma materno (n=10)	0,74 0,73 (0,42-1,04)	0,79 0,74 (0,42-1,06)	0,73 0,70 (0,39-1,01)	0,66 0,71 (0,38-1,03)
Líquido amniótico (ng/mL) (n=5)	1,37 3,48 (-3,99-10,95)	1,49 3,83 (-4,36-12,02)	2,48 6,98 (-6,34-20,30)	3,64 7,69 (-6,07-21,44)
Líquido amniótico/ plasma materno (n=5)	0,44 0,48 (-0,03-0,99)	0,39 0,37 (0,07-0,66)	0,21 1,19 (-1,39-3,76)	0,29 1,09 (-1,18-3,36)

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

1'S,2R versus 1'R,2R; ▲ 1'S,2R versus 1'S,2S; ◆ 1'S,2R versus 1'R,2S; ♣ 1'S,2S versus 1'R,2R; ⊗ 1'S,2S versus 1'R,2S; ■ 1'R,2R versus 1'R,2S.

Tabela 32- Concentrações dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes hipertensas e portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico. Os valores estão expressos pela mediana, média e intervalo de confiança de 95%.

Amostras	R-(+)-AODM	S-(-)-AODM
Plasma materno (ng/mL) (n=11)	241,69 281,19(146,73-415,66)	248,39 276,44(145,92-406,95)
Cordão umbilical (ng/mL) (n=11)	131,37 171,75(90,70-252,80)	117,89 160,59(80,81-240,37)
Cordão umbilical/ plasma materno (n=11)	0,65 0,63(0,51-0,76)	0,63 0,59(0,46-0,73)
Líquido amniótico (ng/mL) (n=5)	28,83 63,11(-33,52-159,75)	33,17 73,48(-50,66-197,62)
Líquido amniótico/ plasma materno (n=5)	0,13 0,21(-0,01-0,44)	0,12 0,25(-0,10-0,61)

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

As Tabelas 33-35 mostram a comparação da distribuição transplacentária dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos entre as pacientes dos Grupos H e HD. A Figura 8 mostra as razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno em função dos tempos entre a administração do metoprolol e a colheita das amostras em parturientes hipertensas (Grupo H).

Tabela 33- Disposição cinética enantiosseletiva do metoprolol (MET) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD. Dados expressos como mediana.

Parâmetro	R(+)MET		S(-)MET	
	H	HD	H	HD
Plasma materno (ng/mL)	12,20	8,57	17,09	13,03
Cordão umbilical (ng/mL)	12,52	3,62	19,25	6,93
Cordão umbilical/ plasma materno	1,04	1,06	1,15	1,08

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

Tabela 34- Disposição cinética estereosseletiva do α -hidroximetoprolol (OHM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD. Dados expressos como mediana.

Parâmetro	1'S,2R-OHM		1'S,2S-OHM		1'R,2R-OHM		1'R,2S-OHM	
	H	HD	H	HD	H	HD	H	HD
Plasma materno (ng/mL)	2,22	8,57*	2,73	4,48	9,28	10,16	12,27	12,86
Cordão umbilical (ng/mL)	3,00	3,62	3,52	2,83	7,81	5,53	11,37	6,46
Cordão umbilical/ plasma materno	1,10	1,06	1,09	0,79*	0,95	0,73*	0,92	0,66*

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

Tabela 35- Disposição cinética enantiosseletiva do ácido O-desmetilmetoprolóico (AODM) em amostras coletadas no momento do parto de pacientes dos Grupos H e HD. Dados expressos como mediana.

Parâmetro	R(+)AODM		S(-)AODM	
	H	HD	H	HD
Plasma materno (ng/mL)	330,44	241,69	325,70	248,39
Cordão umbilical (ng/mL)	238,34	131,37	238,15	117,89
Cordão umbilical/ plasma materno	0,83	0,65	0,83	0,63

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

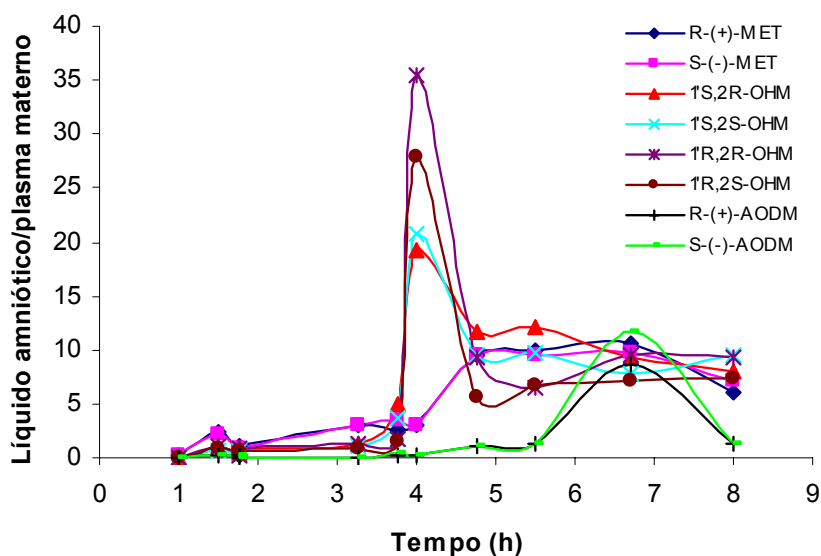


Figura 8 – Razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno em função dos tempos entre a administração do metoprolol e a colheita das amostras em parturientes hipertensas (Grupo H) tratadas com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico (n=11). Cada ponto da curva corresponde a amostra de uma paciente.

O estudo investiga a influência do Diabetes *mellitus* gestacional na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do metoprolol e de seus metabólitos α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico em parturientes hipertensas.

As parturientes hipertensas investigadas foram distribuídas nos grupos controle (Grupo H; n=24) e Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD; n=11) de acordo com os valores de glicemia de jejum e do teste oral de tolerância à glicose com sobrecarga de 75 g de glicose. Os resultados da avaliação bioquímica (Tabela 2 e ANEXO 4) estão dentro dos padrões da normalidade em sua maioria. A análise dos componentes protéicos do sangue demonstrou tendência a hipoproteinemia e hipoalbuminemia, alterações comuns no período gestacional. A concentração de albumina na gravidez diminui aproximadamente 70-80% dos valores normais (ANDERSON, 2005). Os valores do *clearance* de creatinina (183,0 vs 175,5 mL/min/1,73m², respectivamente para os Grupos H e HD; Tabela 2) das parturientes investigadas estão elevados em função do aumento da taxa de filtração glomerular de aproximadamente 50% no primeiro trimestre com aumento contínuo ao longo da gestação (ANDERSON, 2005). A maioria das parturientes investigadas incluídas nos Grupos H e HD são consideradas obesas (39,62 vs 39,03 kg/m², respectivamente para os Grupos H e HD; Tabela 1 e anexo 3). A obesidade altera a disposição cinética do metoprolol em função de suas características de lipossolubilidade com observação de aumento do volume de distribuição e aumento do *clearance*. Entretanto, sem causar alterações aparentes no seu efeito anti-hipertensivo (GALLETTI et al., 1989).

Os recém-nascidos das parturientes incluídas no grupo Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) mostram peso significativamente maior ($p < 0,05$) do que os recém-nascidos das parturientes não diabéticas (Grupo H) (3215 vs 3635 g; Tabela 4), um dado compatível com a flutuação glicêmica materna observada nas pacientes portadoras de diabetes gestacional (HIGGINS & AULIFFE, 2010).

A administração de dose única oral de metoprolol a parturientes resulta em concentrações plasmáticas do fármaco inalterado menores do que aquelas observadas em pacientes não grávidas devido ao aumento do fluido extracelular, redução da concentração plasmática de proteínas totais, aumento da concentração de ácidos graxos livres, aumento da taxa de filtração glomerular e do estado de indução enzimática (ANDERSON, 2005). Logo, a investigação da farmacocinética do metoprolol em parturientes exige métodos analíticos de alta sensibilidade capazes

de quantificar o fármaco até pelo menos 3 vezes a sua meia-vida de eliminação (até aproximadamente 24 h após a administração de dose única oral). Os métodos de análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma humano, empregando HPLC com detecção por fluorescência, anteriormente desenvolvidos e validados pelo grupo (CERQUEIRA et al., 1999; CERQUEIRA et al., 2003a) com limites de quantificação de 1 ng de cada enantiômero do metoprolol/mL de plasma e 5 ng de cada isômero do α -hidroximetoprolol/mL de plasma, não mostraram sensibilidade compatível com a presente investigação.

O presente estudo exigiu o desenvolvimento e a validação de métodos mais sensíveis e específicos para quantificar os enantiômeros do metoprolol e os isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico empregando LC-MS/MS.

Os enantiômeros do metoprolol e os isômeros do α -hidroximetoprolol foram separados na coluna de fase quiral Chiralpak[®] AD de acordo com o procedimento descrito por Cerqueira et al., (2003a). A Figura 4 exhibe a separação dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol com tempo de corrida de aproximadamente 28 min.

Os dados apresentados nas Tabelas 5-8 indicam, respectivamente, que o efeito matriz é praticamente ausente na análise dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol e do padrão interno (antipirina). Os dados mostram valores próximos a 100% quando foram comparadas as áreas dos picos resultantes da injeção de soluções padrão em fase móvel e de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma e líquido amniótico branco obtidos de seis diferentes parturientes.

As curvas de calibração construídas empregando as razões de alturas *versus* concentração dos enantiômeros do metoprolol (0,2-250 ng de cada enantiômero/mL de plasma ou líquido amniótico) e dos isômeros do α -hidroximetoprolol (0,1-125 ng de cada isômero/mL de plasma ou líquido amniótico) mostraram linearidade nos referidos intervalos, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os amplos intervalos lineares (Tabelas 9, 10, 12 e 13) abrangem todas as concentrações experimentadas. Os limites de quantificação de 0,2 ng/mL de plasma ou líquido amniótico para os enantiômeros do metoprolol e de 0,1 ng/mL de plasma ou líquido amniótico para os isômeros do α -hidroximetoprolol permitiram a análise de

amostras de plasma coletadas até 24 h após a administração de dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol racêmico e das amostras de líquido amniótico coletadas no momento do parto. O único método de análise enantiosseletiva do metoprolol em plasma até então reportado na literatura empregando LC-MS/MS (JENSEN et al., 2008) apresenta limite de quantificação de 0,5 ng de cada enantiômero/mL de plasma e não quantifica sequencialmente o metabólito α -hidroximetoprolol. Quanto a análise em líquido amniótico, não existe dados na literatura relativos aos parâmetros de validação.

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão inter e intra-ensaios (Tabelas 9, 10, 12 e 13) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. O metoprolol e seu metabólito α -hidroximetoprolol demonstraram estabilidade em plasma e líquido amniótico durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente, após o processamento durante 24h no auto-injetor a 5°C e durante 12 meses armazenados a -20°C, já que foram revelados desvios inferiores a 15% (Tabelas 11 e 14).

A análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em plasma foi realizada conforme o método desenvolvido e validado por Cerqueira et al. (2003a), o qual emprega HPLC com detecção por fluorescência após a separação dos enantiômeros na coluna de fase quiral Chiralcel® OD-R. O método de análise dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico foi desenvolvido e validado empregando o mesmo procedimento descrito para o plasma.

As curvas de calibração construídas empregando as razões de alturas *versus* concentração dos enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em líquido amniótico mostram linearidade no intervalo de 13,75-1375,0 ng de cada enantiômero/mL, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 e inclusão de todas as concentrações experimentadas. O limite de quantificação de 13,75 ng/mL de líquido amniótico para os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico permitiu a análise de amostras de líquido amniótico coletadas no momento do parto e obtidas no intervalo de 1- 8 h após a administração do metoprolol. Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e a porcentagem de inexatidão inter e intra-ensaios (Tabela 15) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e

repetibilidade dos resultados. O ácido O-desmetilmetoprolóico demonstrou estabilidade em líquido amniótico durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente, após o processamento durante 24h no auto-injetor a 5°C e durante 3 meses armazenados a -20°C, já que foram revelados desvios inferiores a 15% (Tabela 16).

O metoprolol é um fármaco administrado sob a forma racêmica e eliminado principalmente por metabolismo oxidativo dependente do CYP2D6 (70% da dose) (JOHNSON et al., 1996). A razão de extração hepática do metoprolol é de média a alta em pacientes fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6. Conseqüentemente, o *clearance* do metoprolol depende tanto do fluxo de sangue hepático quanto da atividade enzimática (LAURENT-KENESI et al., 1993). A variabilidade intra e interindividual na farmacocinética do metoprolol é dependente da atividade do polimórfico CYP2D6 (TUCKER et al., 2001), o que justifica a determinação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol nas parturientes hipertensas envolvidas na presente investigação.

Os resultados da investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol estão apresentados na Tabela 17. As razões metabólicas de concentrações plasmáticas como misturas isoméricas metoprolol/ α -hidroximetoprolol obtidas 3h após a administração do fármaco marcador foram inferiores a 12,6 (SOHN et al., 1992) para todas as pacientes investigadas designando o fenótipo de metabolizador extensivo (EM) do metoprolol.

Os parâmetros farmacocinéticos dependentes da biodisponibilidade como o *clearance* (Cl) e o volume de distribuição (Vd), são calculados de maneira mais precisa como valores aparentes, ou seja, *clearance* total aparente (Cl/f) e volume de distribuição aparente (Vd/f) uma vez que o metoprolol foi administrado às parturientes hipertensas somente por via oral e não há dados da biodisponibilidade dos enantiômeros individuais do metoprolol na população investigada.

A disposição cinética do metoprolol é enantiosseletiva nas parturientes hipertensas incluídas no grupo controle (Grupo H). Os valores de concentração plasmática máxima (C_{max}), área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$), tempo médio de residência (MRT), Cl/f e Vd/f mostram diferenças com significância estatística ($p < 0,05$) entre os enantiômeros do metoprolol. Os maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ para o S-(-)-metoprolol em relação ao seu antípoda (113,42 vs

62,65 ng.h/mL) resultam em menores valores de Cl/f (3,19 vs 5,29 L/h/Kg) e em razões $AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$ inferiores a unidade (Tabela 18). Razões enantioméricas $AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)}$ de 1,39 foram anteriormente relatadas por Johnson & Burlew, (1996) na investigação de voluntários sadios tratados com dose única de metoprolol racêmico.

Os valores de Cl/f do R-(+)-metoprolol (5,29 L/h/Kg) e do S-(-)-metoprolol (3,19 L/h/Kg) apresentados na Tabela 18 são maiores do que aqueles reportados para pacientes hipertensos e voluntários sadios incluindo homens e mulheres não grávidas. Os valores de Cl/f para os enantiômeros do metoprolol reportados por Cerqueira et al., (2005) na investigação de pacientes hipertensos com função renal normal tratados com doses múltiplas de metoprolol foram de 1,53 vs 1,26 L/h/kg, respectivamente para os enantiômeros R-(+) e S-(-)-metoprolol. Dados similares foram relatados por Boralli, (2006) na investigação de voluntários sadios tratados com dose única oral de metoprolol racêmico (2,31 vs 1,66 L/h/kg, respectivamente para os enantiômeros R-(+) e S-(-)-metoprolol).

Os valores de Cl/f do metoprolol como mistura isomérica relatados por Hogstedt et al., (1983) na investigação de pacientes durante o terceiro trimestre da gestação e durante 12 a 23 semanas após o parto mostram aumento de mais de 4 vezes durante a gestação (4,92 vs 2,17 L/h/kg). Os maiores valores de Cl/f para ambos os enantiômeros obtidos na presente investigação são esperados em função do estado de indução enzimática observado durante a gestação, considerando que o metoprolol é um fármaco eliminado por metabolismo hepático e com excreção renal sob a forma inalterada < 10% (HÖGSTEDT et al., 1983). O aumento da atividade do CYP2D6 durante a gestação também foi reportado por Wadelius et al., (1997) com a observação de redução em 53% na razão metabólica dextrometorfano/dextrorfano em gestantes genotipadas como EM para o CYP2D6 (0,0025 vs 0,0035 respectivamente na semana 36 da gestação e 7-11 semanas após o parto). Por outro lado, as gestantes genotipadas como metabolizadores pobres (PM) para o CYP2D6 mostraram aumento da razão metabólica de 63% durante a gestação (2,53 vs 1,55 respectivamente na semana 36 da gestação e 7-11 semanas após o parto). Ressalta-se ainda que o CYP2D6 usualmente não é expresso no fígado fetal ou na placenta a termo e que as alterações fisiológicas observadas durante a gestação tais como o esvaziamento gástrico, o fluxo sanguíneo hepático e a ligação a proteína

plasmática não diferem entre os genótipos EM e PM para o CYP2D6 (WADELIUS et al., 1997).

O parâmetro V_d/f também mostra enantiosseletividade para as pacientes investigadas do grupo controle (Grupo H). Os dados apresentados na Tabela 18 mostram maiores valores para o R-(+)-metoprolol do que para o S-(-)-metoprolol (56,73 vs 26,87 L/kg). As diferenças entre os valores de V_d/f não podem ser explicadas em função de prováveis alterações na ligação às proteínas plasmáticas considerando a baixa ligação do metoprolol às proteínas plasmáticas (aproximadamente 11%). Logo, diferenças na biodisponibilidade oral entre os enantiômeros R-(+) e S-(-)-metoprolol podem contribuir para a observação de enantiosseletividade no parâmetro V_d/f . Boralli, (2006) também reporta maior valor de V_d/f para o enantiômero R-(+)-metoprolol em voluntários sadios tratados com dose única oral do fármaco racêmico (5,7 e 4,0 L/Kg). Os maiores valores de V_d/f para ambos os enantiômeros do metoprolol obtidos para as parturientes hipertensas investigadas podem ser explicados em função do aumento do volume do líquido extracelular durante a gestação (LOEBSTEIN et al., 1997).

A formação do metabólito α -hidroximetoprolol mostrou ser estereosseletiva para as pacientes investigadas do grupo controle (Grupo H), favorecendo a formação do novo centro quiral 1'R (Figura 6-II). Na Tabela 19 pode ser observada diferença com significância estatística ($p < 0,05$) entre os isômeros 1'S *versus* 1'R em relação aos parâmetros C_{max} e $AUC^{0-\infty}$. O favorecimento da formação do novo centro quiral 1'R está de acordo com os estudos da literatura empregando microsomas de fígado humano (MURTHY et al., 1990). As razões de $AUC^{0-\infty}_{1'R/1'S}$ de 2,84 apresentadas na Tabela 19 para as parturientes hipertensas investigadas estão de acordo com os valores reportados por Cerqueira et al., (2005) na investigação de pacientes hipertensos (2,87) e com os dados reportados por Boralli, (2006) na investigação de voluntários sadios (3,07).

A formação do metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico apresentou enantiosseletividade (Tabela 20, Figura 6-III) com observação de maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ para o enantiômero R-(+) (2,77 vs 2,66 $\mu\text{g.h/mL}$). Mistry et al., (2002) reportam que voluntários sadios tratados com solução oral de metoprolol racêmico exibem favorecimento na formação do R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico ($AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)} = 0,85$). Cerqueira et al., (2005) e Boralli, (2006) também relatam maiores

valores de $AUC^{0-\infty}$ para o enantiômero R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico na investigação respectivamente de pacientes hipertensos e voluntários sadios.

O favorecimento na formação do enantiômero R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico explica o acúmulo plasmático do S-(-)-metoprolol, considerando que a O-desmetilação contribui para a eliminação de aproximadamente 65% da dose de metoprolol em pacientes EM para o CYP2D6 (JOHNSON & BURLEW, 1996).

O Diabetes *mellitus* pode alterar a farmacocinética por diversos mecanismos, incluindo alteração na absorção intestinal, distribuição, metabolismo e eliminação dos fármacos em uso na clínica (PRESTON et al., 2001; ANGER & PIQUETTE-MILLER, 2010).

A hiperglicemia é considerada como a causa dos danos teciduais no diabetes, seja em função das alterações no metabolismo celular da glicose ou do acúmulo a longo prazo de biomoléculas glicadas e produtos finais da glicação avançada. Os processos de glicação afetam a circulação de proteínas como albumina sérica, insulina, hemoglobina e glicoproteínas, enquanto a formação dos produtos finais da glicação avançada, representados por um grupo heterogêneo de produtos químicos resultantes da reação não enzimática entre açúcares e proteínas, lípidos e/ou ácidos nucleicos, implica em intermédios reativos e resultam no estresse oxidativo entre outras complicações (NEGRE-SALVAYERE et al., 2009). O estresse oxidativo associado com o mecanismo molecular de diminuição na biossíntese e secreção de insulina consiste na principal etiologia da toxicidade glicêmica, responsável por complicações causadas pelo Diabetes *mellitus*. A extensão dessas complicações depende do tempo de diagnóstico da doença e do controle dos níveis glicêmicos (KAWAHITO et al., 2009).

A expressão das enzimas hepáticas CYP é regulada por hormônios e sofre alterações acentuadas no Diabetes *mellitus*. Os níveis de glucagon são elevados no diabetes e a expressão do CYP2C11 em ratos machos é *down-regulated* no diabetes considerando que a razão glucagon/insulina no sangue influencia a expressão do mRNA CYP2C11. A concentração intracelular de adenosina monofostato cíclico (cAMP) no fígado depende da razão no sangue glucagon/insulina. O glucagon ativa a síntese de cAMP e usa o nucleotídeo como segundo mensageiro para a transdução do sinal, enquanto a insulina estimula a degradação do cAMP ativando a fosfodiesterase. O grau de supressão do

CYP2C11 pelo glucagon é atenuado na presença de altas concentrações de insulina. Logo, o tratamento do diabetes experimental com insulina reverte os efeitos do diabetes na expressão do CYP2C11 (IBER et al., 2001).

No presente estudo foram investigadas parturientes hipertensas portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) que não faziam uso de insulina e que apresentavam bom controle dos níveis glicêmicos (hemoglobina glicada <6,5%, Tabela 2).

A enantiosseletividade na farmacocinética do metoprolol nas parturientes incluídas no Grupo HD é similar aquela relatada para as parturientes do grupo controle (Grupo H). Os parâmetros apresentados na Tabela 21 mostram maiores valores de $AUC^{0-\infty}$ (125,32 vs 84,63 ng.h/mL) e menores valores de Cl/f (3,05 vs 4,85 L/h/Kg) e Vd/f (20,18 vs 25,60 L/kg) para o enantiômero S-(-)-metoprolol. A formação do metabólito α -hidroximetoprolol também mostra estereosseletividade semelhante a descrita para o grupo controle (Grupo H) com observação de favorecimento na formação do novo centro quiral 1'R com razões de $AUC^{0-\infty}_{1'R/1'S}$ de 3,27 (Figura 7-II e Tabela 22). A formação do ácido O-desmetilmetoprolóico, de maneira também similar ao grupo controle, mostra acúmulo plasmático do enantiômero R-(+) ($AUC^{0-\infty}_{S-(-)/R-(+)} = 0,91$; Tabela 23).

Ao compararmos os dados farmacocinéticos das parturientes hipertensas do Grupo H com as do Grupo HD (Tabelas 24-26) observa-se prolongamento do t_{max} para ambos os enantiômeros do metoprolol, para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol e para ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico nas parturientes portadoras de DMG (Grupo HD). O retardo na velocidade de absorção de ambos os enantiômeros do metoprolol nas pacientes do Grupo HD pode ser explicado em função das anormalidades motoras causadas pelo diabetes no estômago e no intestino delgado (PRESTON, 2001).

Em relação ao ácido O-desmetilmetoprolóico também existe diferença com significância estatística entre os Grupos H e HD no parâmetro $AUC^{0-\infty}$. Os dados apresentados na Tabela 26 mostram que as parturientes portadoras de DMG (Grupo HD) mostram acúmulo plasmático de ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico (3,68 vs 2,77 μ g.h/mL para o R-(+) e 3,41 vs 2,66 μ g.h/mL). A formação do ácido O-desmetilmetoprolóico depende do CYP3A e provavelmente de outras isoformas do CYP e representa a principal via de eliminação do metoprolol

em pacientes EM para o CYP2D6 (65% da dose) (MURTHY et al., 1990; JOHNSON & BURLEW, 1996; BORALLI et al., 2009). Estudos anteriores do grupo mostram redução da atividade do CYP3A em pacientes portadores de Diabetes *mellitus* tipo 2 descompensada ou em pacientes com Diabetes *mellitus* gestacional (MARQUES et al., 2002; MOISÉS et al., 2008). Logo, a redução na atividade do CYP3A no diabetes não explica o acúmulo plasmático de ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico no Grupo HD. Alterações na atividade do CYP2D6 no diabetes também não contribuem para explicar o acúmulo plasmático do referido metabólito considerando que no presente estudo a disposição cinética do α -hidroximetoprolol dependente da atividade do CYP2D6 não foi alterada. Logo, redução na atividade de outras isoformas do CYP provavelmente envolvidas na formação do ácido O-desmetilmetoprolóico assim como possíveis alterações na capacidade de eliminação do metabólito em pacientes portadores de Diabetes *mellitus* gestacional poderiam explicar o acúmulo plasmático de ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico observado no Grupo HD.

Borbás et al., (2006) mostram correlações significativas entre os níveis de glicose no sangue de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina e a atividade do CYP total, CYP1A, CYP3A e FMO no fígado assim como com a atividade do CYP3A intestinal. Os estudos clínicos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa também sinalizam alterações na atividade do CYP somente em pacientes com diabetes descompensada. Boralli, (2006) reporta que o Diabetes *mellitus* tipo 2 compensado não altera a disposição cinética e o metabolismo enantiosseletivos do metoprolol.

A placenta de maneira similar ao fígado também está envolvida no metabolismo de fármacos, embora os mRNAs do CYP1A1, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5 e CYP4B1 estejam expressos na placenta a termo em níveis muito mais baixos do aqueles reportados para o fígado. Estudos *in vitro* e *in vivo* reportam que o diabetes pode alterar a atividade de enzimas hepáticas e proteínas transportadoras de fármacos. No entanto, o diabetes gestacional parece não alterar a atividade de enzimas CYP na placenta (MCROBIE et al., 1998)

A distribuição transplacentária de fármacos ocorre em geral por difusão passiva, um processo dependente do fluxo sanguíneo placentário, pH do sangue materno e sangue fetal, propriedades físico-químicas do fármaco, extensão da ligação do fármaco às proteínas plasmáticas, expressão do transportador de efluxo

P-gp na placenta e afinidade do fármaco pela glicoproteína P (P-gp) (PROUILLAC & LECOEUR, 2010). A distribuição transplacentária do metoprolol e seu metabólito α -hidroximetoprolol como mistura isomérica é extensa com razões de concentrações cordão umbilical/plasma materno próximas a 1 (LINDEBERG et al., 1987).

Os dados apresentados nas Tabelas 27 e 28 mostram as razões de concentrações cordão umbilical/plasma materno para os enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos obtidas na investigação das parturientes hipertensas incluídas no grupo controle (Grupo H). Os valores obtidos são próximos a unidade para ambos os enantiômeros do metoprolol e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol. Em relação a distribuição transplacentária do ácido O-desmetilmetoprolóico as razões são próximas a 0,8 para ambos os enantiômeros (Tabela 29). A ausência de enantiosseletividade na distribuição transplacentária do metoprolol e seus metabólitos pode ser explicada em função do fármaco não ser um substrato do transportador de efluxo P-gp e não exercer nenhuma ação na expressão da P-gp (COLLETT et al., 2004).

A distribuição transplacentária dos enantiômeros do metoprolol e seu metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico nas parturientes portadoras de Diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) pode ser considerada similar aos dados obtidos para o Grupo H (Tabelas 33 e 35). No entanto, a distribuição transplacentária dos isômeros 1'S,2S; 1'R,2R; e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol é aproximadamente 20% menor quando comparada ao Grupo H (Tabela 34). O presente dado não pode ser justificado em função de metabolismo na placenta, considerando que a formação do α -hidroximetoprolol depende do CYP2D6, uma isoforma não expressa na placenta a termo (MCROBIE et al., 1998).

O metoprolol e seus metabólitos também são distribuídos no líquido amniótico (LINDEBERG et al., 1987). O líquido amniótico representa o produto de numerosas trocas com o feto. A exposição do feto ao líquido amniótico ocorre através da inalação pelo trato respiratório, deglutição pelo trato gastrintestinal assim como pela possível absorção transdérmica. O feto a termo deglute de 210-760 mL/dia de líquido amniótico e produz 600-800 mL de urina/dia de maneira independente do volume do líquido amniótico. Logo, o líquido amniótico pode representar uma fonte importante de exposição fetal aos fármacos em uso na clínica (LINDEBERG et al., 1987; LOUGHHEAD et al., 2006).

As concentrações do S-(-)-metoprolol são maiores do que aquelas do R-(+)-metoprolol no líquido amniótico das parturientes hipertensas investigadas incluídas no Grupo H (Tabela 27). As concentrações de ambos os enantiômeros do metoprolol são maiores no líquido amniótico do que no plasma materno com razões líquido amniótico/plasma materno de 3,0 para o R-(+)-metoprolol e 3,2 para o S-(-)-metoprolol. As razões líquido amniótico/plasma materno do α -hidroximetoprolol são de 5,1 para o isômero 1'S,2R; 4,0 para o 1'S,2S; 1,6 para o 1'R,2R e 2,3 para o isômero 1'R,2S α -hidroximetoprolol (Tabela 28), mostrando que os isômeros 1'S,2R e 1'S,2S do α -hidroximetoprolol são acumulados no líquido amniótico em maior extensão do que os enantiômeros do metoprolol. Ressalta-se que o α -hidroximetoprolol é um metabólito ativo com potência de aproximadamente 1/10 do metoprolol em termos de redução da frequência cardíaca (MURTHY et al., 1990). Ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico atingem menores concentrações no fluido amniótico do que no plasma das parturientes hipertensas investigadas incluídas no Grupo H (Tabela 29). As razões de concentrações líquido amniótico/plasma materno são menores que aquelas observadas para o metoprolol e α -hidroximetoprolol (0,29 e 0,37 respectivamente para o R-(+)- e S-(-)-ácido O-desmetilmetoprolóico).

As concentrações dos enantiômeros do metoprolol e seus metabólitos no líquido amniótico sofrem a influência do tempo entre a administração do fármaco e a colheita do líquido amniótico em função da dinâmica referente aos processos envolvidos na formação do líquido amniótico. Os dados apresentados na Figura 8 mostram a influência do tempo entre a administração do metoprolol e a colheita do líquido amniótico nas razões enantioméricas de concentrações líquido amniótico/plasma materno referentes as parturientes incluídas no Grupo H. Os dados permitem inferir que embora os valores de t_{max} para o plasma materno estejam entre 1,5-2h para o metoprolol e seus metabólitos (Tabelas 18-20), as maiores razões líquido amniótico/plasma materno para ambos os enantiômeros do metoprolol e para os isômeros do α -hidroximetoprolol são observadas a partir de 4h da administração oral do metoprolol e permanecem estáveis até aproximadamente 8 h da administração. As razões líquido amniótico/plasma materno para ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico permanecem baixas até 8h após a administração do metoprolol.

Estudos anteriores também relatam maiores concentrações do metoprolol e do α -hidroximetoprolol como misturas isoméricas no líquido amniótico do que no plasma materno de parturientes hipertensas tratadas com doses múltiplas de metoprolol racêmico. Os autores reportam que as maiores razões líquido amniótico/plasma materno tanto para o metoprolol quanto para o α -hidroximetoprolol foram observadas 5 h após a administração do metoprolol (LINDEBERG et al., 1987).

O grupo de parturientes portadoras de diabetes *mellitus* gestacional (Grupo HD) foi constituído apenas por 5 parturientes para a investigação da distribuição do metoprolol e seus metabólitos no líquido amniótico, sendo que o tempo entre a administração do metoprolol e a colheita do fluido amniótico variou entre 1,5-3,5h (Anexo 9, Tabelas xxxi-xxxviii). Os dados apresentados nas Tabelas 30-32 mostram que não houve acúmulo do metoprolol e seus metabólitos no líquido amniótico provavelmente em função da colheita da amostra ter sido realizada antes do tempo necessário para o equilíbrio de distribuição dos fármacos (4-8h para as parturientes do Grupo H). Logo, não foram realizadas análises estatísticas para avaliar a influência do Diabetes *mellitus* gestacional na distribuição dos fármacos no líquido amniótico.

Concluindo, a disposição cinética do metoprolol é enantiosseletiva com acúmulo plasmático do eutômero S-(-)-metoprolol em todas as parturientes investigadas portadoras ou não de Diabetes *mellitus* gestacional compensada. O acúmulo plasmático do S-(-)-metoprolol pode ser explicado em função do metabolismo preferencial do R-(+)-metoprolol ao R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico. O Diabetes *mellitus* gestacional prolonga o t_{max} para ambos os enantiômeros do metoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol. Os isômeros 1'S,2R e 1'S,2S do α -hidroximetoprolol são distribuídos no líquido amniótico em maior extensão do que os enantiômeros do metoprolol, enquanto a distribuição do ácido O-desmetilmetoprolóico no referido compartimento é pouco significativa. A distribuição transplacentária dos enantiômeros do metoprolol e seu metabólito ácido O-desmetilmetoprolóico não sofre influência do Diabetes *mellitus* gestacional. No entanto, a doença reduz em aproximadamente 20% a distribuição transplacentária dos isômeros 1'S,2S; 1'R,2R; e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol.

1- O método de análise sequencial dos enantiômeros do metoprolol e dos isômeros do α -hidroximetoprolol em plasma e líquido amniótico empregando LC-MS/MS apresenta limites de quantificação compatíveis com a aplicação em farmacocinética de dose única oral do metoprolol em parturientes.

2- A disposição cinética do metoprolol é enantiosseletiva em parturientes hipertensas com observação de maiores concentrações plasmáticas e menor *clearance* total aparente para o eutômero S-(-)-metoprolol. A formação do metabólito α -hidroximetoprolol também é estereosseletiva com favorecimento do novo centro quiral 1'R. O favorecimento da formação do R-(+)-ácido O-desmetilmetoprolóico explica o acúmulo plasmático do S-(-)-metoprolol.

3- O Diabetes *mellitus* gestacional compensado prolonga o t_{max} para ambos os enantiômeros do metoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol. O Diabetes *mellitus* gestacional compensado não altera as razões isoméricas de concentrações plasmáticas do metoprolol, α -hidroximetoprolol e ácido O-desmetilmetoprolóico

4- As concentrações de ambos os enantiômeros do metoprolol e de todos os isômeros do α -hidroximetoprolol são maiores no líquido amniótico do que no plasma materno. No entanto, os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico atingem menores concentrações no líquido amniótico do que no plasma materno.

5- A distribuição transplacentária é próxima a 1 para ambos os enantiômeros do metoprolol e para todos os isômeros do α -hidroximetoprolol e próxima a 0,8 para ambos os enantiômeros do ácido O-desmetilmetoprolóico em parturientes hipertensas. O Diabetes *mellitus* gestacional compensado reduz em aproximadamente 20% a distribuição transplacentária dos isômeros 1'S,2S; 1'R,2R; e 1'R,2S- α -hidroximetoprolol.

7 Referências Bibliográficas

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diab. Care**, New York, v. 31, Suppl.1, p. S55-S60, 2008.
2. ANDERSON, G.D. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v. 44 (10), p. 989-1008, 2005.
3. ANDRADE, S.E.; RAEBEL, M.A.; BROWN, J.; LANE, K.; LIVINGSTON, J.; BOUDREAU, D.; ROLNICK, S. J.; ROBLIN, D.; SMITH, D.H.; DAL PAN, G.J.; SCOTT, P.E.; PLATT, R. Outpatient use of cardiovascular drugs during pregnancy. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, Chichester Wiley , v. 17, n.3, p.240-247, 2008.
4. ANGER, G. J.; PIQUETTE-MILLER, M.; Impact of hyperlipidemia on plasma protein binding and hepatic drug transporter and metabolic enzyme regulation in a rat model of gestational diabetes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 334,p. 21-32, 2010.
5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos. **Diário Oficial**, 30 de maio de 2003.
6. 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. B**, Amsterdam, v. 553, p. 391-7, 1991.
7. BARTON, J.R. Hypertension in pregnancy. **Ann. Emerg. Med.**, St. Louis, v. 51, n.2, p. 1-2, 2008.
8. BASCI, N.E.; BOZKURT, A.; JOHNSON, R.; RAMSAY, C.H.; SKANBERG, I. Correlation between the metabolic ratios of debrisoquine and metoprolol in Turkish subjects. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 75, p. 62-4, 1994.
9. BORALLI, V.B. Farmacocinética-farmacodinâmica e estereosseletividade no metabolismo do metoprolol: estudo experimental e investigação de voluntários sadios e pacientes portadores de diabetes melito. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2006.
10. BORALLI, V.B.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. **Chirality**, New York, v.21, p. 886-893, 2009.

11. BORBÁS, T.; BENKÓ, B.; DALMADI, B.; SZABÓ, I.; TIHANYI, K. Insulin in flavin-containing monooxygenase regulation flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 activities in experimental diabetes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 28, p. 51-58, 2006.
12. BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: An update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester Wiley, v. 27, p. 387-406, 2006.
13. 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**, New York, v. 11, p. 591-597, 1999.
14. 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, Amsterdam**, v. 783, p. 433-441, 2003a.
15. CERQUEIRA, P.M.; CESARINO, E.J.; BERTUCCI, C.; BONATO, P.S.; LANCHOTE, V.L. Stereoselective metabolism of metoprolol: enantioselective analysis of α -hydroxymetoprolol in plasma and urine. **Chirality**, New York, v. 15, p. 542-49, 2003b.
16. CERQUEIRA, COELHO, E.B.; GELEILETTE, T. J. M.; GOLDMAN, G. H.; LANCHOTE, V.L. Influence of chronic renal failure on stereoselective metoprolol metabolism in hypertensive patients. **J. Clin. Pharmacol.**, Thousand Oaks, v. 45, p. 14422-33, 2005.
17. CHENG, P.Y.; MORGAN, E.T. Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. **Curr. Drug Metab.**, Netherlands, v.2, n.2, p.165-183, 2001.
18. COCKCROFT, D. W.; GAULT, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron**, Los Angeles, v. 16, p. 31-41, 1976.
19. COLLETT, A.; TANIANIS-HUGHES, J.; WARHURST, G. Rapid induction of P-glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions? **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 68, p. 783-790, 2004.
20. DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2009.

21. DUCHARME, J.; FERNANDEZ, C.; GIMENEZ, F.; FARINOTTI, R. Critical issues in chiral drug analysis in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, v.686, p.65-75, 1996.
22. EMAMI, J., PASSUTTO, F.M., JAMALI, F., Effect of experimental diabetes mellitus and arthrits on the pharmacokinetics of hydroxychloroquine enantiomers in rats. **Pharma. Res.**, New York, v. 15, n. 6, p.897-903, 1998.
23. FERRÃO, M.H.L.; PEREIRA, A.C.; GERSGORIN, H.C.T.S.; PAULA, T.A.A.; CORRÊA, R.R.M.; CASTRO, E.C.C. Efetividade do tratamento de gestantes hipertensas. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, São Paulo, v.52, n.6, p. 390-4, 2006.
24. FINNSTRÖM, O.; EZITIS, J., RYDÉN G.; WICHMAN, K. Neonatal effects of beta-blocking drugs in pregnancy. **Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.**, Copenhagen, v.118, p.91-93, 1984.
25. FOSTER, C.D. & MACDONALD, I.A. The assay of the catecholamine content of small volumes of human plasma. **Biom. Chromatogr.**, London, v. 13, p. 209-15, 1999.
26. FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 63, p. 321-333, 2007.
27. GALLETTI, F.; FERRARA, L. A.; GROPPA, A.; MONTAGNA, M.; MANCINI, M. Obesity and beta-blockers: influence of body fat on their kinetics and cardiovascular effects. **J. Clin. Pharmacol.**, Thousand Oaks, v. 29, p. 212-6, 1989.
28. GODBILLON, J.& DUVAL, M. Determination of two metoprolol metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 309, p. 198-202, 1984.
29. 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.**, Amsterdam, v. 567, p. 181-91, 1991.
30. HIGGINS M.; MC AULIFFE F. A review of maternal and fetal growth factors in diabetic pregnancy. **Curr. Diabetes Rev.**, San Francisco, v. 6, p. 116-25, 2010.
31. HÖGSTEDT, S.; LINDEBERG, B.; RANE, A. Increased oral clearance of metoprolol in pregnancy. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 24, p. 217-220, 1983.

32. HÖGSTEDT, S.; LINDEBERG, B.; PENG, D.R.; REGÄRDH, C.G.; RANE, A. Pregnancy-induced increase in metoprolol metabolism. **Clin. Pharmacol. Ther.**, New York, v. 37, p. 688-692, 1985.
33. IBER, H.; LI-MASTERS, T.; CHENG, Q.; YU S.; MORGAN E. T. regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting, and inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v.297, p. 174-180, 2001.
34. JENSEN, B.P.; SHARP, C.F.; GARDINER, S.J.; BEGG, E.J. Development and validation of a stereoselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quantification of S- and R- metoprolol in human plasma. **J. Chromatogr. B, Amsterdam**, v. 865, p.48-54, 2008.
35. KNOTT, C.; REYNOLDS F. Therapeutic drug monitoring in pregnancy rationale and current status. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.19, n.6, p.425-433, 1990.
36. JOHNSON, J.A. & BURLEW, B.S. Metoprolol metabolism via cytochrome P4 502D6 in ethnic populations. **Drug Metabol. Dispos.**, Baltimore, v. 24 (3), p. 350-5, 1996.
37. KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v.15, p. 4137-4142, 2009.
38. KROEMER, H.K.; FROMM, M.F.; EICHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. **Ther. Drug Monit.**, New York, v.18, p. 388-92, 1996.
39. 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, Amsterdam**, v. 738, p. 27-37, 2000.
40. LAURENT-KENESI, M.; FUNCK-BRENTANO, C.; POIRIER, J. M.; DECOLIN, D.; JAILLON, P. Influence of CYP2D6-dependent metabolism on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol and nicardipine, alone and in combination. **Br. J. Clin. Pharmac.**, London, v. 36, p. 531-538, 1993.
41. LENNARD, M.S. Quantitative analysis of metoprolol and three of its metabolites in urine and liver microsomes by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B, Amsterdam**, v.342, p. 199-205, 1985.

42. LENNARD, M.S.; TUCKER, G.T.; WOODS, H.F. The polymorphic oxidation of β -adrenoceptor antagonists. Clinical pharmacokinetic considerations. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v. 11, p. 1-17, 1986.
43. 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.**, Amsterdam, v. 668, p. 67-75, 1995.
44. LINDEBERG, S.; LUNDBORG, P.; REGÄRDH, C.G.; SANDSTRÖM, B. Disposition of the adrenergic blocker metoprolol and its metabolite OH-metoprolol maternal plasma, amniotic fluid and capillary blood of the neonate. **Acta Obst. Gynecol. Scand. Suppl.**, Copenhagen, v.118, p. 61-64, 1984.
45. LINDEBERG, S.; SANDSTRÖM, P.L.; REGÄRDH, C.G. Disposition of the adrenergic blocker metoprolol in the late-pregnant woman, the amniotic fluid, the cord blood and the neonate. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.33, p. 363-368, 1987.
46. LINDHEIMER, M.D.; TALER, S.J.; CUNNINGHAM, F.G. Hypertension in pregnancy. **J. Am. Soc. Hypertens.**, New York, v.4, p.68-78, 2010.
47. LOEBSTEIN, R.; LALKIN, A.; KOREN, G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.33, n.5, p.328-343, 1997.
48. LOUGHHEAD, A. M.; FISHER, A. D.; NEWPORT, D. J; RITCHIE, J. C.; OWENS, M. J.; DEVANE, C. L.; STOWE, Z. N. Antidepressants in amniotic fluid: another route of fetal exposure. **Am. J. Psychiatry**, Hanover, v. 163, p. 145-147, 2006.
49. MAGEE, L.A.; ORNSTEIN, M.P.; VON DADELSZEN, P. Management of hypertension in pregnancy. **Br. J.Obstet. Gynaecol.**, Oxford, v. 318, p.1332-6,1999.
50. MAGEE, L.A.; VON DADELSZEN, P.; CHAN, S.; GAFNI, A.; GRUSLIN, A.; HELIEWA, M.; HEWSON, S.; KAVUMA, E.; LEE, S.K; LOGAN, A.G.; MCKAY, D.; MOUTQUIN, J.-M.; OHLSSON, A.; REY, E.; ROSS, S.; SINGER, J.; WILLAN, A.R.; HANNAH, M.E.; for the CHIPS Pilot Trial Collaborative Group. The control of hypertension in pregnancy study pilot trial. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, London, v. 114, p. 770-e20, 2007.
51. MARQUES, M. P.; COELHO, E. B.; SANTOS, N. A. G.; GELEILETE, T. J. M.; LANCHOTE, V. L. Dynamic and kinetic disposition of nisoldipine enantiomers in

- hypertensive patients presenting with type-2 diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 58, p. 607-14, 2002.
52. MCROBIE, D. J.; GLOVER, D. D.; TRACY, T. S. Effects of gestational and overt diabetes on human placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 26, p. 367-371, 1998.
53. MINISTÉRIO DA SAUDE. Relação de Medicamentos Essenciais – RENAME, Série B. **Textos Básicos da Saúde**, Brasília, 4ª edição, 284 p., 2006.
54. 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. Pharm. Biomed Anal.**, New York, v. 16, p. 1041-1049, 1998.
55. MOISÉS, E.C.D.; DUARTE, L.B.; CAVALLI, R.C.; MARQUES, M.P.; LANCHOTE, V.L.; DUARTE, G.; CUNHA, S.P. Pharmacokinetics of lidocaine and its metabolite in peridural anesthesia administered to pregnant women with gestational diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 64, p. 1189-1196, 2008.
56. MURTHY, S.S.; SHETTY, H.U.; NELSON, W.L.; JACKSON, P.R.; LENNARD, M.S. Enantioselective and diastereoselective aspect of the oxidative metabolism of metoprolol. **Bioch. Pharmacol.**, New York, v. 40, n. 7, p. 1637-1644, 1990.
57. NATION, R.L. Chirality in new drug development. Clinical pharmacokinetic considerations. **Clin. Pharmacokinet.**, New York, v.27, p.249-55, 1994.
58. NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM (NHBPEP). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 183, p. S1-S22, 2000.
59. NEGRE-SALVAYERE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid. Redox Signal.**, New York, v.11, p.3071-3109,2009.
60. ÖSTLUND, I.; HAGLUND, B.; HANSON, U. Gestacional diabetes and preeclampsia. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v. 113, p. 12-16, 2004.
61. POGGI, J.C., BARISSA, G.R., DONADI, E.A., LANCHOTE, V.L., REIS, M.L.; Enantioselective kinetic disposition of fenoprofen in rats with experimental

- diabetes or adjuvant-induced arthritis. **Pharmacology**, Basel, v.72, n.2, p.85-91, 2004.
62. PRESTON, R. A.; CHUNG, M.; GAFFNEY, M.; ALONSO, A.; BALODANO, N. M.; EPSTEIN, M. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine in hypertensive patients with and without type II diabetes mellitus. **J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 41, p.1215-1224,2001.
63. PROUILLAC, C.; LECOEUR, S. The role the placenta in fetus exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters, human models for transfer studies. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, 2010.
64. ROCHA, A.; COELHO, E.B.; LANCHOTE, V.L. Stereospecific disposition of fluvastatin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Can. J. Pharmacology**, Ottawa, v. 80, p. 1071-5, 2002.
65. RODEN, D.M. Mirror, mirror on the wall. Stereochemistry in therapeutics. **Circulation**, Hagerstown, v.89, p.2451-3, 1994.
66. SANDSTRÖM, B. Antihypertensive treatment with the adrenergic beta-receptor blocker, metoprolol, during pregnancy. **Gynec. Obstet. Invest.**, v. 9, p. 518, 1978.
67. SANDSTRÖM, B. Adrenergic beta-receptor blockers in hypertension of pregnancy. **Clin. Exp. Hypertens. B.**, New York, v. 1, n. 1, p. 127-141, 1982.
68. SHAW, M.A. News insights into drugs metabolism and toxicology. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v.51, p.209-212, 2001.
69. SEERINGER, A.; BROCKMÖLLER, J. Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise-induced heart rate. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 64, p. 883-888, 2008.
70. SPAHN, H.; WELLSTEIN, A.; PFLUGMAN, G.; MUTSCHHLER, E.; PALM, D. Radioceptor assay of metoprolol in human plasma: comparison with an enantiospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) procedure. **Pharm. Research**, New York, v. 6, n. 2, p. 152-5, 1989.
71. SIBAI, B.M., ROSS, M.G. Hypertension in gestational diabetes mellitus: pathophysiology and long-term consequences. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, Perugia, v. 23, p. 229-33, 2010.

72. 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.**, New York, v.14, n.3,p.184-189,1992.
73. TUCKER, G.T.; LENNARD, M.S. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v.45, p.309-29, 1990.
74. TUCKER, G.T.; HOUSTON, B.; HUANG, S.W. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 70, p. 103-14, 2001.
75. XIAOTAO, Q.; HALL, S.D. Enantioselective effects of experimental diabetes mellitus on the metabolism of ibuprofen. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 274, p. 1192-98, 1995.
76. WADELIUS, M.; DARJ, E.; FRENNE, G.; RANE, A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 62, p. 400-407,1997.
77. WAHLUND, G.; NERME, V.; ABRAHAMSSON, T.; SJÖQUIST, P. The β_1 and β_2 -adrenoceptor affinity and β_1 -blocking potency of S- and R-metoprolol. **Br. J. Pharmacol.**, London, v. 99, p. 592-596, 1990.
78. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Report of a WHO consultation**, Geneva, 1999.