

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em voluntários  
sadios metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6

Carolina Pinto Vieira

Ribeirão Preto

2011

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em  
voluntários sadios metabolizadores extensivos ou lentos para o  
CYP2D6**

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

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientada:** Carolina Pinto Vieira

**Orientadora:** Profa Dra Vera Lucia Lanchote

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto  
2011

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.

Vieira, Carolina Pinto

Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6

Orientadora: Vera Lucia Lanchote. Ribeirão Preto, 2011.

83p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Lanchote, Vera Lucia

1. Nebivolol; 2. Enantiômeros; 3. Farmacocinética;  
4. voluntários sadios

## Folha de Aprovação

Carolina Pinto Vieira

Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios  
metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6

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: \_\_\_\_\_

*Dedicatória*

**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 Valéria, pela educação a mim dispensada, pela minha formação e pelos mais belos exemplos de honestidade e dignidade

Por estar sempre presente, ainda que de longe, em todos os momentos felizes e tristes da minha vida.

E, sobretudo pelo seu amor incondicional.

À minha avó Helena pelo seu forte apoio na orientação de minha vida, em virtude de sua fonte de sabedoria derivada da longa experiência.

Ao meu pai Eduardo, Andressa, meus irmãos Matheus e Vinícius por estarem sempre ao meu lado e apoiarem minhas escolhas.

*Agradecimiento*

## **Meus sinceros agradecimentos**

À Profa Dra Vera Lucia Lanchote, pela orientação, pelo enriquecimento científico, profissional e pessoal proporcionado neste período.

Aos voluntários, que 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, Francine, Juciane, Natália, Natalícia, Estela, Rodrigo, Otávio e Giovana, pelas trocas de experiências profissionais e pessoais, pela inestimável ajuda e pelo carinho no nosso convívio diário.

Ao meu amigo Daniel, pelo carinho, pela sua paciência e ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu amigo Glauco, pelas incansáveis ajudas nos programas de computador.

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 Clínica Médica e Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) pela parceria e contribuição no desenvolvimento do trabalho clínico, na seleção e coleta das amostras dos voluntários

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



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

À minha amiga Thalita pela amizade e apoio tão fundamentais.

Ao Kid, meu fiel e grande amigo.

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

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*Resumo*

VIEIRA, C.P. **Farmacocinética e PK-PD dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O nebivolol, um fármaco com quatro centros quirais, está disponível na clínica como mistura racêmica dos isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS). A atividade  $\beta$ -adrenérgica do nebivolol reside no isômero *d*-nebivolol, enquanto o *l*-nebivolol promove a liberação de óxido nítrico das células endoteliais. O nebivolol é eliminado por metabolismo dependente do CYP2D6. O estudo avalia a farmacocinética e a relação farmacocinética-farmacodinâmica (PK-PD) dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios. Foram investigados 15 voluntários sadios (10 homens e 5 mulheres) fenotipados com metoprolol como metabolizadores extensivos (EM, n=13) ou metabolizadores lentos para o CYP2D6 (PM, n=2). Os voluntários sadios foram tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. As amostras seriadas de sangue foram coletadas até 48 h após a administração do fármaco. Os isômeros do nebivolol foram resolvidos na coluna Chirobiotic<sup>®</sup> V e analisados nas amostras de plasma empregando LC-MS/MS. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados por modelo bicompartimental com *lag time*, empregando o programa WinNonLin. A farmacodinâmica do nebivolol foi avaliada empregando como parâmetro a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico durante 2 min utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima. A análise PK-PD relacionando o efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol foi avaliada empregando o modelo  $E_{max}$  sigmóide inibitório. A disposição cinética do nebivolol é enantiosseletiva nos voluntários sadios EM, com razões isoméricas de  $AUC_l/AUC_d$  de 1,41. Os valores de concentração plasmática máxima (1,46 vs 0,79 ng/mL), área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (6,45 vs 3,99 ng.h/mL), *clearance* aparente (774,51 vs 1252,70 L/h) e volume de distribuição aparente (10936 vs 19082 L) mostram diferenças com significância estatística (Teste de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) entre os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol para os voluntários sadios EM. A disposição cinética do nebivolol não é enantiosseletiva nos voluntários sadios PM investigados, com razões isoméricas de  $AUC_l/AUC_d$  de 0,93 e 0,98. Os valores de *clearance* aparente obtidos para os voluntários PM (87-350 vs 81-344 L/h, respectivamente para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol) são menores do que para os EM (775 vs 1253 L/h). O modelo  $E_{max}$  sigmóide inibitório descreveu a análise PK-PD relacionando o efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em voluntários sadios EM com valores de  $E_{max}$  de 4,47 bpm (IC 95% 1,37-7,57) e de  $EC_{50}$  de 222,16 pg/mL (IC 95% 96,29-540,60 pg/mL).

Palavras-chave: nebivolol, enantiômeros, farmacocinética, voluntários sadios

*Abstract*

**VIEIRA, C.P. Pharmacokinetics and PK-PD of the isomers of nebivolol in healthy volunteers extensive metabolisers or poor metabolisers for CYP2D6.**

2011. 83p Dissertation (Master Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Nebivolol is a drug with four chiral centers. It is administered in clinical practice as a racemic mixture of the isomers *d*-nebivolol (SRRR) and *l*-nebivolol (RSSS).

The  $\beta$ - blocking activity of nebivolol is attributed to *d*-nebivolol, whereas *l*-nebivolol promotes the release of nitric oxide from endothelial cells. Nebivolol is eliminated by metabolism dependent on CYP2D6. The present study evaluates the pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) of nebivolol isomers in healthy volunteers (10 men and 5 women) phenotyped with metoprolol as extensive metabolisers (EM, n=13) or poor metabolisers for CYP2D6. The healthy volunteers received a single oral dose of 10mg of racemic nebivolol. Serial blood samples were collected from 0 to 48 h after the administration of nebivolol. The isomers of nebivolol were analyzed by LC-MS-MS on a Chirobiotic® V column and the pharmacokinetic parameters (bicompartiment model, micro, lag time, first order) were calculated by the software Winnonlin. The pharmacodynamic of nebivolol was evaluated using the variation of heart rate as parameter between the end and one minute before the handgrip exercise. Thus, the patients were oriented to conduct the isometric exercise with handgrip for 2 min at 30% of their maximum voluntary contractility. The PK-PD analysis relating the effect on the variation of heart rate induced by the isometric exercise and the plasma concentrations of the isomer *d*-nebivolol were evaluated using the Inhibitory effect sigmoid Emax model. The kinetic disposition of nebivolol is enantioselective on healthy volunteers EM, with isomeric ratios of  $AUC_l/AUC_d$  of 0,93 e 0,98. The values of maximum plasma concentration (1,46 vs 0,79 ng/mL), area under the concentration time curve (6,45 vs 3,99 ng.h/mL), apparent clearance (774,51 vs 1252,70 L/h) and volume of distribution (10936 vs 19082 L) show statistically significant differences ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test) between the isomers *l*-nebivolol and *d*-nebivolol for the healthy volunteers EM. The kinetic disposition of nebivolol is not enantioselective on the healthy volunteers PM investigated, with isomeric ratios of  $AUC_l/AUC_d$  of 1,07. The values of apparent clearance obtained for the volunteers pm (87-350 vs 81-344 L/h, respectively to *l*-nebivolol and *d*-nebivolol) are smaller than that for EM (775 vs 1253 L/h). The Inhibitory effect sigmoid Emax model described the PK-PD analysis described the effect on the variation of heart rate induced by handgrip isometric exercise with the plasma concentrations of the isomer *d*-nebivolol in healthy volunteers EM with Emax values of 4,47 bpm (IC 95% 1,37-7,57) and EC50 of 222,16 pg/mL (IC 95% 96,29-540,60 pg/mL).

Key-words: nebivolol, enantiomers, pharmacokinetics, healthy volunteers.

## *Lista de Figuras*

Figura 1: Estrutura do nebivolol e seus principais metabólitos .....	2
Figura 2: Metabolismo do nebivolol .....	4
Figura 3: Gráfico do tamanho amostral em relação ao poder do teste .....	12
Figura 4: Espectro de massas do íon molecular protonado e do íon produto do nebivolol e do íon molecular protonado e do íon produto do tramadol (PI) .....	24
Figura 5: Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma .....	25
Figura 6: Cromatogramas referentes à análise do metoprolol e do $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina .....	27
Figura 7: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13) .....	29
Figura 8: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos isômeros do nebivolol no voluntário sadio 14 tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico .....	30
Figura 9: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos isômeros do nebivolol no voluntário sadio 15 tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico .....	30
Figura10: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos isômeros do nebivolol nos (n=13) voluntários fenotipados como metabolizadores extensivos e as curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos isômeros do nebivolol nos voluntários 14 e 15 fenotipados como metabolizadores lentos para o CYP2D6.....	31
Figura11: Curvas de variação da frequência cardíaca <i>versus</i> tempo para os voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13).....	34
Figura12: Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero <i>d</i> -nebivolol em função do efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13) .....	34

## *Lista de Tabelas*



Tabela 1: Características dos voluntários investigados (n=15) .....	23
Tabela 2: Efeito matriz para os isômeros do nebivolol e padrão interno (PI) em quatro diferentes lotes de plasma humano.....	25
Tabela 3: Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma .....	26
Tabela 4: Estudo da estabilidade do método de análise dos isômeros do nebivolol .....	27
Tabela 5: Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=15) .....	28
Tabela 6: Disposição cinética enantiosseletiva do nebivolol em voluntários sadios classificados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico(n=13).....	32
Tabela 7: Disposição cinética enantiosseletiva do nebivolol em voluntários sadios classificados como metabolizadores lentos do CYP2D6 tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico(n=2).....	33
Tabela 8: Parâmetros obtidos na análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas <i>d</i> -nebivolol em função do efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13) .....	35

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$\alpha$ -OHM:  $\alpha$ -hidroximetoprolol

Cl<sub>Cr</sub>: *clearance* de creatinina

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CV: coeficiente de variação

CYP: citocromo P450

DOQI: Disease Outcomes Quality Initiative

EM: metabolizador extensivo

EPM: erro padrão da média

ESI: *electrospray*

HDL: High Density Lipoprotein

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%: intervalo de confiança 95%

IMC: índice de massa corporal

LDL: Low Density Lipoprotein

LIQ: limite inferior de quantificação

LC: cromatografia líquida

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

MET: metoprolol

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS/MS: espectrometria de massas

NYHA: New York Heart Association

PA: pressão arterial

PI: padrão interno

PM: metabolizador lento

r: coeficiente de correlação linear

AST: aspartato aminotransaminase

ALT: alanina aminotransaminase

v/v: volume/volume

## *Lista de Símbolos*

AUC<sup>0-∞</sup>: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

Cl: *clearance* total

Cl/f: *clearance* total aparente

C<sub>max</sub>: concentração plasmática máxima

PK/PD: farmacocinética-farmacodinâmica

t<sub>max</sub>: tempo para atingir a C<sub>max</sub>

t<sup>1/2</sup> : meia-vida de eliminação

Vd: volume de distribuição

Vd/f: volume de distribuição aparente

®: marca registrada

*Sumário*

<b>Resumo</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Símbolos</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>8</b>
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos .....	9
<b>3 Casuística e Métodos</b> .....	<b>10</b>
3.1 Casuística.....	11
3.1.1 Aspectos éticos do projeto .....	11
3.1.2 Cálculo amostral.....	11
3.1.3 Seleção dos voluntários sadios .....	12
3.1.3.1 Critérios de inclusão .....	12
3.1.3.2 Critérios de exclusão .....	12
3.2 Protocolo clínico .....	13
3.3 Análise enantiosseletiva do nebivolol em plasma .....	14
3.3.1 Soluções padrão e reagentes.....	14
3.3.2 Análises cromatográficas .....	14
3.3.2.1 Preparo das amostras .....	15
3.3.2.2 Determinação do efeito matriz.....	15
3.3.2.3 Curvas de calibração.....	16
3.3.2.4 Validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.....	16
3.3.2.4.1 Recuperação .....	16
3.3.2.4.2 Linearidade e limite de quantificação .....	16
3.3.2.4.3 Precisão e exatidão .....	17
3.3.2.4.4 Estabilidade .....	17
3.4. Análise do metoprolol e $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina .....	18
3.4.1. Soluções padrão e reagentes.....	18
3.4.2. Análise Cromatográfica .....	18
3.4.3. Procedimento de extração.....	19



3.5 Análise farmacocinética.....	19
3.6 Análise farmacocinética-farmacodinâmica .....	20
3.7 Análise estatística .....	21
<b>4 Resultados .....</b>	<b>22</b>
4.1 Características dos voluntários sadios investigados .....	23
4.2 Análise do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS .....	23
4.2.1 Validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.....	26
4.3 Análise do metoprolol e $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina .....	27
4.3.1 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol.....	28
4.4 Farmacocinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios .....	29
4.5. Farmacocinética-farmacodinâmica do nebivolol.....	33
<b>5 Discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>45</b>
<b>7 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>47</b>
<b>8 Anexos .....</b>	<b>52</b>

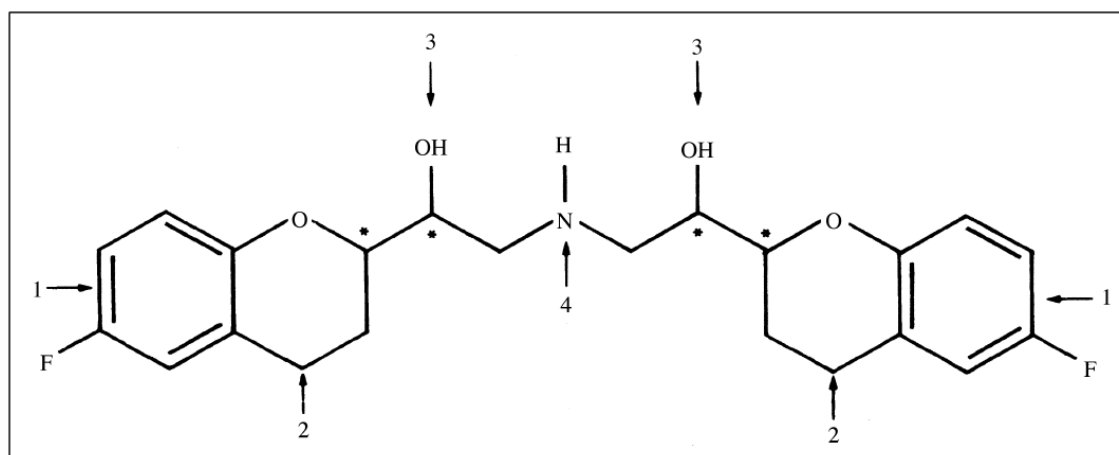
## *1 Introdução*

A hipertensão arterial atinge 30% da população adulta mundial. A Sociedade Brasileira de Hipertensão relata prevalência da doença na população adulta entre 22,3% a 43,9% (PINTO et al., 2011). Estima-se que no ano de 2025, 1,5 bilhões de pessoas serão hipertensas no mundo (SHARMA & HAKIM, 2011).

Os beta-bloqueadores são considerados fármacos de primeira escolha no tratamento da hipertensão (BAEK et al., 2008). Os beta-bloqueadores não seletivos ou os bloqueadores dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos incluem o propranolol, o pindolol, o nadolol, o timolol e o labetalol, entre outros. Os beta-bloqueadores seletivos dos receptores  $\beta_1$  incluem o metoprolol, o atenolol, o esmolol, o acebutolol, o nebivolol, entre outros.

O nebivolol é um beta-bloqueador de terceira geração altamente seletivo dos receptores  $\beta_1$  com ação vasodilatadora mediada pelo óxido nítrico e com efeitos benéficos na função endotelial vascular. O nebivolol é usado na clínica no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca crônica (SELVAN et al, 2007; MUNZEL et al., 2009).

O nebivolol, 1-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-[[2-(6-fluor-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-2-il)-2-hidroxi-etil]amino]etan-1-ol (Figura 1), um fármaco com quatro centros quirais, está disponível na clínica como mistura racêmica dos isômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS) (SELVAN et al.; 2007).



**Figura 1:** Estrutura do nebivolol e principais sítios de metabolismo. \* denota os centros quirais. Principais sítios de metabolismo: 1-hidroilação aromática, 2-oxidação alicíclica, 3-glicuronidação; 4 -N-desalquilação.

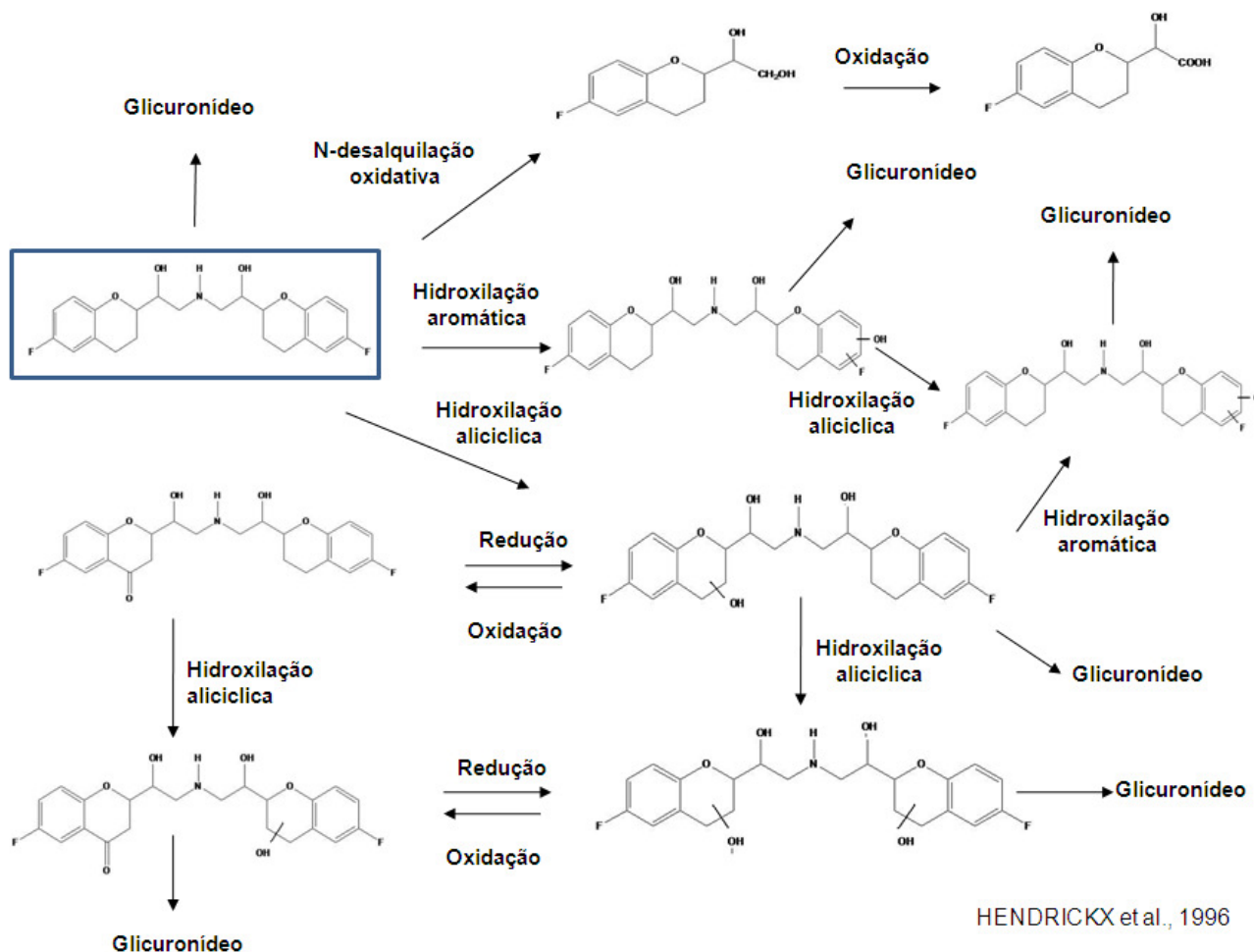
A atividade  $\beta$ -adrenérgica do nebivolol reside no isômero *d*-nebivolol, pois a afinidade do *l*-nebivolol para os receptores  $\beta_1$  adrenérgicos é 175 vezes menor (PAUWELS et al., 1991). Um estudo duplo cego, randomizado e cruzado mostrou que em voluntários sadios o *l*-nebivolol não atenua o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica induzidas pelo exercício, enquanto 5 mg de nebivolol racêmico ou 2,5 mg de *d*-nebivolol atenua com significância estatística os referidos parâmetros (NUETEM & CREE, 1998). No entanto, vários outros mecanismos, além do bloqueio de adrenoceptores  $\beta_1$  estão envolvidos nas propriedades hemodinâmicas do nebivolol. O *l*-nebivolol, em doses que não interferem com os receptores  $\beta$  adrenérgicos, reduz a pressão arterial sanguínea. O *l*-nebivolol promove a liberação de óxido nítrico das células endoteliais, enquanto o *d*-nebivolol é destituído desta atividade. Esses achados contribuem para explicar a redução na resistência vascular periférica relatada para o nebivolol racêmico. Os efeitos do nebivolol racêmico na função ventricular esquerda são principalmente devido a ação  $\beta$ -bloqueadora do *d*-nebivolol, enquanto o *l*-nebivolol melhora os efeitos hemodinâmicos do *d*-nebivolol. Logo, o nebivolol racêmico reduz a pressão sistólica e a pressão diastólica e causa redução da resistência vascular periférica, sem deprimir a função ventricular esquerda (EVANGELISTA et al., 2007; MANGRELLA et al., 1998).

O nebivolol é um fármaco altamente lipofílico (coeficiente de distribuição octanol/água  $\log P = 4,03$ ) com eliminação dependente principalmente do metabolismo hepático. A fração da dose excretada na urina sob a forma inalterada é menor que 0,05% (CHEYMOL et al., 1997).

O metabolismo do nebivolol ocorre via N-desalquilação direta, glicuronidação e complexa hidroxilação aromática como mostra a Figura 2. As vias de N-desalquilação e hidroxilação são dependentes da atividade do CYP2D6, uma enzima que exhibe polimorfismo genético (INGELMAN-SUDBERG & RODRIGUEZ-ANTONA, 2005; LINDAMOOD et al.; 2010).

O polimorfismo genético pode influenciar a farmacocinética e a farmacodinâmica de muitos fármacos em uso na clínica. Com base no polimorfismo genético do CYP2D6 as populações são classificadas como metabolizadores extensivos (EM), metabolizadores lentos (PM) e metabolizadores ultrarápidos (UM) (LU, 2007). A frequência de metabolizadores extensivos na população caucasiana é

de 70-80% e de metabolizadores lentos (PM) é de 7 a 10% (FUX et al., 2005; FRANK et al., 2007; LU, 2007).



**Figura 2:** Metabolismo do nebivolol (HENDRICKX et al., 1996)

A hidroxilação aromática representa a principal via de metabolismo do nebivolol em metabolizadores extensivos (EM). Os metabólitos hidroxilados do *d*-nebivolol apresentam atividade  $\beta$ -bloqueadora, enquanto os metabólitos hidroxilados do *l*-nebivolol retêm a capacidade do fármaco inalterado de promover a liberação de óxido nítrico das células endoteliais, embora em menor extensão (PRISANT et al., 2008; MAFFEI et al., 2006). A N-desalquilação, uma via também dependente do CYP2D6, é pouco significativa tanto em pacientes EM quanto em pacientes PM (VAN PEER et al., 1991).

A glicuronidação constitui uma importante via metabólica do nebivolol e os conjugados com o ácido glicurônico são considerados farmacologicamente ativos. Os metabólitos encontrados no plasma em maior quantidade são os conjugados com o ácido glicurônico e os produtos N-desalquilados. Os conjugados hidroxilados são encontrados no plasma de pacientes EM, mas não no plasma de pacientes PM. Considerando que tanto os metabólitos hidroxilados quanto os conjugados são considerados ativos, os efeitos clínicos do nebivolol não diferem entre os pacientes fenotipados como PM ou EM para o CYP2D6. Ressalta-se ainda que em pacientes EM e em doses iguais ou menores que 10 mg, o nebivolol é preferencialmente  $\beta_1$  seletivo, sendo que em pacientes PM ou em doses maiores que 10 mg, o nebivolol inibe tanto os receptores  $\beta_1$  quanto os receptores  $\beta_2$  adrenérgicos (LINDAMOOD et al., 2010).

A biodisponibilidade oral do nebivolol é de 12% em pacientes EM e 96% em pacientes PM (VAN PEER et al., 1991). O tempo para atingir a concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ) é de 0,5-2h em pacientes EM e de 3-6h em pacientes PM após a administração de dose única oral de 15 mg. A administração oral de nebivolol 5mg/dia durante 7 dias resulta em maiores valores de concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) em pacientes PM do que em pacientes EM (VAN PEER et al., 1991).

O volume de distribuição do nebivolol é alto, com valores variando de 10,1-39,4 L.Kg<sup>-1</sup>. A meia-vida de eliminação do nebivolol é de aproximadamente 8h em pacientes EM e de 27 h em pacientes PM. As diferenças observadas nos valores de meia-vida de eliminação entre pacientes EM e PM são decorrentes dos valores de *clearance*, os quais são aproximadamente 4 vezes menores em pacientes PM (30 vs 111 L/h). Os metabólitos do nebivolol são excretados nas fezes e na urina de pacientes EM, respectivamente representando 44% e 38% da dose. Em pacientes PM, os valores correspondentes são de 13% e 66% da dose (VAN PEER et al., 1991).

Os enantiômeros individuais de um racemato, caracterizados por diferentes orientações espaciais, podem apresentar um perfil farmacológico e/ou toxicológico distinto, em razão dos diferentes processos de ligação dos fármacos com macromoléculas biológicas quirais. 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 enantiosseletividade na farmacocinética é de interesse para os fármacos quirais que exibem propriedade farmacodinâmicas distintas entre os enantiômeros. Sabe-se que os receptores, as proteínas plasmáticas, as proteínas transportadoras e as enzimas são capazes de discriminar entre os enantiômeros de um racemato (CASLAVSKA & THORMANN, 2011; TUCKER et al., 1990; NATION, 1994; DUCHARME et al., 1996; KROEMER et al., 1996; BROCKS, 2006).

A enantiosseletividade manifesta-se nos processos farmacocinéticos relacionados com a absorção dependente de carreadores, com a ligação às proteínas plasmáticas, com os processos de secreção biliar, excreção renal e no metabolismo. No entanto, o metabolismo é o processo que apresenta maior influência na estereosseletividade observada na farmacocinética (OIAN & HALL, 1995; KROEMER et al., 1996; BROCKS, 2006; LU, 2007).

Os parâmetros farmacocinéticos dos isômeros do nebivolol estão até então descritos somente para a administração intravenosa do nebivolol racêmico em voluntários sadios e em pacientes obesos. Os autores mostram valores próximos de área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo (47,8 vs 48,0 µg.h/L), *clearance* (48,6 vs 48,4 L/h) e volume de distribuição (599 vs 739 L), respectivamente apresentados para os isômeros *d*-nebivolol e *l*-nebivolol, em voluntários sadios tratados com dose única intravenosa de 0,073 mg/kg de peso corporal ideal do fármaco racêmico (CHEYMOL et al., 1997).

Os estudos de administração oral do nebivolol racêmico administrado em regime de dose múltipla a voluntários sadios mostram acúmulo plasmático do isômero *l*-nebivolol (os valores de AUC do *l*-nebivolol são aproximadamente o dobro daqueles do *d*-nebivolol, considerando a soma do fármaco inalterado e dos metabólitos hidroxilados) (VAN PEER et al., 1991; HIMMELMANN et al., 1996).

A relação entre a concentração do fármaco e a resposta biológica do organismo pode ser analisada simultaneamente utilizando modelos matemáticos. A farmacodinâmica pode ser definida como uma relação quantitativa entre as concentrações plasmáticas e/ou teciduais do fármaco observadas, e a magnitude do efeito farmacológico observado (MÉGARBANE et al., 2008).

O exercício isométrico com o *handgrip* induz aumento da pressão arterial acompanhado por aumento da frequência cardíaca e da resistência vascular na

musculatura esquelética em repouso (KAMIYA et al., 2001). Duprez et al. (1991) avaliaram a influência do nebivolol na hemodinâmica cardiovascular, durante o exercício isométrico, em voluntários saudáveis tratados durante 7 dias com doses diárias de 5 mg de nebivolol racêmico. Os autores mostraram que o nebivolol reduziu de maneira aguda e crônica a pressão arterial sanguínea devido a redução na frequência cardíaca e no débito cardíaco.

A presente investigação abrange o estudo da farmacocinética dos isômeros do nebivolol e a avaliação da relação farmacocinética-farmacodinâmica, empregando as concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol em função da variação na frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em voluntários saudáveis, metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral do fármaco racêmico.



## *2 Objetivos*

## 2.1 Geral

Avaliar a farmacocinética dos isômeros do nebivolol e a relação farmacocinética- farmacodinâmica em voluntários sadios tratados com o fármaco racêmico em regime de dose única.

## 2.2 Específicos

- Desenvolver e validar o método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS e com aplicação em estudo de disposição cinética de dose única.
- Avaliar o fenótipo CYP2D6 dos voluntários sadios usando o metoprolol como fármaco marcador.
- Avaliar a enantiosseletividade na farmacocinética do nebivolol em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos ou lentos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral do fármaco racêmico.
- Estabelecer a relação PK-PD (farmacocinética-farmacodinâmica) entre as concentrações plasmáticas do eutômero *d*-nebivolol e a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em voluntários sadios tratados com dose única oral do fármaco racêmico.

### *3 Casuística e Métodos*

### 3.1 Casuística

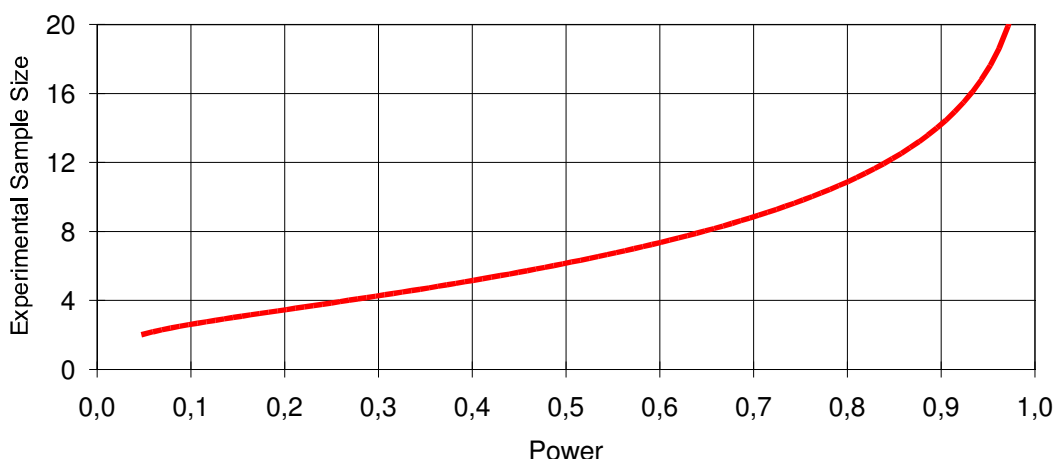
#### 3.1.1 Aspectos éticos do projeto

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HCFMRP-USP), em sua 295ª Reunião Ordinária realizada em 14/09/2009, Processo HCRP 4887/2009 (ANEXO 1).

Todos os voluntários investigados 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. Os voluntários sadios durante o estudo foram internados na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP.

#### 3.1.2 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi obtido através do programa *Power and Sample Calculation*, versão 2.1.30 (DUPONT & PLUMMER, 1997), utilizando parâmetros farmacocinéticos do nebivolol em voluntários sadios obtidos a partir de concentrações plasmáticas de misturas isoméricas do nebivolol. Para o cálculo do tamanho amostral fixou-se o nível de significância em  $P > 0,05$ , poder de 80% e diferença entre as médias de AUC dos isômeros do nebivolol em 50% (AUC 7,76 ng.h/mL e desvio padrão de 3,07) (KAMALI et al., 1997). A Figura 2 mostra a variação do poder do teste t pareado de acordo com o tamanho amostral. Como pode ser observado na Figura 3, a inclusão de 11 voluntários sadios irá resultar em poder do teste acima de 80%.



**Figura 3:** Gráfico do tamanho amostral em relação ao poder do teste.

### 3.1.3 Seleção dos voluntários sadios

#### 3.1.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na investigação voluntários sadios ( $n= 15$ ) com função hepática (dosagem sérica de ALT, AST, gama GT, bilirrubina e proteínas totais), função renal (dosagem sérica de uréia e creatinina) e com avaliação metabólica (dosagem sérica do colesterol, triglicérides, HDL, LDL e glicemia de jejum) dentro dos limites da normalidade (Anexo 4).

#### 3.1.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da investigação os voluntários portadores de insuficiência cardíaca congestiva moderada ou grave (classificação NYHA acima de 2), insuficiência renal crônica moderada ou grave (creatinina sérica maior que 1,4 mg/dL ou *clearance* de creatinina <60 mL/min, classificação DOQI estágios acima de 2), diabetes *mellitus* (definido de acordo com os critérios da ADA, ou seja, glicemia de jejum acima de 126 mg/dL), estenose das artérias renais, hiperaldosteronismo primário, hipertensão grave (pressão arterial acima de 180 x110 mmHg), hipertensão refratária (vigência de quatro medicamentos antihipertensivos de classes distintas sem controle da PA), acidente vascular encefálico isquêmico ou hemorrágico recente

(há menos de 6 meses), angina instável ou infarto agudo do miocárdio há menos de 6 meses, doença hepática ativa (vírus B/C, alcoolismo e hepatopatia secundária ao uso de medicamentos), pacientes com doenças graves com risco de morte, pacientes em uso de medicamentos que possam inibir ou induzir o CYP2D6 e pacientes com doenças psiquiátricas que afetem o juízo crítico da realidade e todos os voluntários que não concordarem em assinar o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 3.2 Protocolo clínico

Os voluntários sadios investigados receberam, via oral, dose única de 2 comprimidos de 5 mg de nebivolol racêmico (Nebilet<sup>®</sup>, Biolab, Brasil) com 200 mL de água. As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em seringas heparinizadas (Liquemine<sup>®</sup> 5000UI, Roche) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 10; 12,16, 20, 24, 30, 36, 42 e 48h após a administração do fármaco. Os plasmas para análise cromatográfica foram obtidos por centrifugação (2500 rpm durante 15 min) das amostras de sangue e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

O registro da resposta simpática frente ao teste de esforço isométrico (frequência cardíaca), utilizando o *handgrip* Jamar<sup>®</sup> (Simmons Preston, EUA), foi realizado nos mesmos tempos de colheita de sangue. Os voluntários foram monitorados utilizando o monitor multiparamétrico DIXTAL (modelo 2021) durante o período da investigação.

Os voluntários em posição supina, antes da administração do nebivolol, foram solicitados a utilizar o *handgrip* na sua contratilidade voluntária máxima, com o braço dominante. A média da contratilidade voluntária máxima foi obtida após 3 determinações. Em todos os tempos de colheita de sangue (0-48 h), os voluntários foram solicitados a realizar durante 2 min o exercício isométrico com o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima (KUBO et al., 2001).

A avaliação da atividade *in vivo* do CYP2D6 foi realizada 48 h após a administração do nebivolol. Os voluntários receberam uma dose única oral de 1 comprimido 100 mg de tartarato de metoprolol (Seloken, AstraZeneca) com 200 mL de água. A urina foi coletada até 8h após a administração do fármaco, o volume total foi mensurado e uma alíquota armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A razão de excreção urinária metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol maior que 12,6 (log

metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol > 1,10) foi definida como o fenótipo de metabolizador lento (HORAI et al., 1990).

### 3.3 Análise enantiosseletiva do nebivolol em plasma

#### 3.3.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de nebivolol racêmico (cloridrato de nebivolol 98%, TRC, North York, Canadá) foi preparada na concentração de 50  $\mu\text{g}$  da base livre/mL de metanol. A partir desta solução foram realizadas as diluições para a obtenção das soluções de uso, nas concentrações 2; 4; 8; 20; 40; 80 e 200 ng de cada isômero do nebivolol/mL de metanol.

A solução do padrão interno tramadol (TRC, North York, Canadá) foi preparada na concentração de 50  $\mu\text{g}$ /mL de metanol.

Os solventes empregados nos procedimentos de extração e como fase móvel do sistema cromatográfico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) como grau cromatografia.

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 Análises cromatográficas

A separação dos isômeros do nebivolol foi realizada na coluna Chirobiotic<sup>®</sup> V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm) empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina(100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1,0 mL/min a 24 °C.

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 *electrospray* (ESI). As análises foram executadas no modo de ionização 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  $2,58 \times 10^{-3}$  mbar. A

voltagem do cone foi mantida em 40V para o nebivolol e para o padrão interno. A energia de colisão foi de 30 eV para o nebivolol e para o padrão interno.

As condições de otimização do MS/MS foram obtidas por infusão direta das soluções padrão de nebivolol (20 µg/mL de metanol) e tramadol (50 µg/mL de metanol) preparadas na fase móvel e introduzidas com bomba de infusão, na vazão de 10 µL/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 406>151 para o nebivolol e 264>58 para o PI tramadol. 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 2 mL de plasma branco (Hemocentro HCFMRP-USP) enriquecidas com 25 µL da solução de padrão interno (tramadol) foram alcalinizadas com 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1M e adicionadas de 50 mg de cloreto de sódio e 4 mL do solvente extrator éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v). Os tubos foram agitados somente até formar o vortex e depois permaneceram no agitador horizontal durante 40 min. Após o procedimento de centrifugação (10 min a 2500 rpm, 15°C), 3,6 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos cônicos e concentrados sob fluxo de ar em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados em 130 µL de fase móvel e 100 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

### 3.3.2.2 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das áreas dos picos do nebivolol e padrão interno injetados diretamente na fase móvel, com as áreas dos picos de alíquotas de plasma branco, oriundas de quatro diferentes voluntários, submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.2.1 e enriquecidas com soluções padrão de nebivolol e padrão interno.



### 3.3.2.3 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram construídas com a análise de alíquotas de 2 mL de plasma branco enriquecidas com 25 µL de cada uma das soluções de uso de nebivolol. As concentrações plasmáticas correspondem a 25; 50; 100; 250; 500; 1000 e 2500 pg de cada isômero do nebivolol/mL. Para a construção das curvas de calibração, as concentrações foram relacionadas no eixo  $x$ , e as razões de áreas dos picos no eixo  $y$ .

### 3.3.2.4 Validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma

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 de plasma branco (n=6) enriquecidas com soluções padrão de nebivolol (40; 1000 e 2000 pg de cada isômero/mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.3.2.1. A recuperação foi analisada através da comparação direta das áreas dos picos do nebivolol e PI adicionados a extratos de plasma branco com as áreas dos picos do nebivolol e PI adicionados a alíquotas de plasma branco e submetidos ao procedimento de extração.

#### 3.3.2.4.2 Linearidade e limite de quantificação

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração plasmática de nebivolol quantificada com precisão de 20% e exatidão de 80-120%. Assim, foram analisadas 10 replicatas na concentração de 25 pg de cada isômero/mL de plasma.

A linearidade do método analítico foi avaliada através da análise de alíquotas de 2 mL de plasma branco enriquecidas com nebivolol nas concentrações de 25; 50; 100; 250; 500; 1000 e 2500 pg cada isômero/mL de plasma. O método foi

considerado linear até a maior concentração plasmática que apresentou desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal e com coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

#### **3.3.2.4.3 Precisão e exatidão**

A repetibilidade e a exatidão do método foi avaliada através de estudos intra e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações de 40; 1000 e 2000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma. Essas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrída foram analisadas 10 alíquotas dessas soluções através de uma única curva de calibração. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 alíquotas de cada uma das soluções de nebivolol durante 5 diferentes corridas.

A avaliação da precisão intra e intercorridas 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 duração. Para a avaliação da estabilidade do nebivolol foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com concentrações baixa e alta de nebivolol (40 e 2000 pg de cada isômero do nebivolol/mL de plasma humano).

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 horas, após esse período, foram descongeladas e congeladas novamente por 24 horas, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de descongelamento quando foram extraídas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor por um período de 12 horas, sendo, então injetadas no sistema cromatográfico. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas foram mantidas na bancada por 4 horas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos após análise das amostras recém preparadas.

Os resultados dos estudos de estabilidade foram expressos em porcentagem de desvio.

### **3.4. Análise do metoprolol e $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina**

O método de análise do metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina foi desenvolvido e validado em estudo anterior no Laboratório de Farmacocinética e Metabolismo da FCFRP-USP (NEVES, 2009).

#### **3.4.1. Soluções padrão e reagentes**

As soluções estoque de metoprolol (tartarato de metoprolol - 97%, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e  $\alpha$ -hidroximetoprolol ( $\alpha$ -OH metoprolol 100%, Toronto Research Chemicals Inc, North York, Canadá) foram preparadas na concentração de 100  $\mu$ g/mL de metanol. A partir desta solução foram realizadas as diluições para a obtenção das soluções de uso nas concentrações de 0,8; 1,6; 4; 16; 32 e 80  $\mu$ g de metoprolol e 0,4; 0,8; 2; 8; 16 e 40  $\mu$ g de  $\alpha$ -hidroximetoprolol /mL de metanol.

A solução do padrão interno tramadol (cloridrato de tramadol 99%, Globe Química, Janssen-Cilag, Alemanha) foi preparada na concentração de 1mg/mL de metanol. A partir dessa solução foi realizada diluição para a obtenção da solução de uso na concentração de 50  $\mu$ g/mL de metanol.

#### **3.4.2. Análise Cromatográfica**

Para a análise do metoprolol e do  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina foi empregado um sistema cromatográfico constituído por bomba, auto-injetor com controlador de

temperatura em 12°C e detector por fluorescência, operando em 229 nm (excitação) e 298 nm (emissão). Foi empregada a coluna Select B LiChrospher 60 RP (250 x 4 mm, tamanho da partícula 5 µm, Merck) e fase móvel constituída de tampão fosfato 0,05 M pH 3,5: acetonitrila (9:1 v/v) com fluxo de 1 mL/min.

### 3.4.3. Procedimento de extração

Alíquotas de 100 µL de urina foram adicionadas de 25 µL da solução de padrão interno (tramadol 50 µg/mL), 25 µL da solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M, 100 mg de cloreto de sódio e 2 mL do solvente extrator diclorometano:éter diisopropílico (1:1, v/v). A extração foi realizada através de agitação durante 30 min em agitador horizontal (220 ± 10 ciclos/min), seguida de centrifugação a 2500 rpm durante 5 min, separação das fases orgânicas (1,6 mL) e concentração sob fluxo de ar em temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados em 150 µL de fase móvel, dos quais 100 µL foram submetidos à análise cromatográfica.

As curvas de calibração par a análise de metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina foram construídas com dados obtidos após a análise de alíquotas de 100 uL de urina branco (obtido de voluntário sadio não tratado com medicamentos nas últimas 72h) enriquecidas de 25 uL de cada solução de uso de metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol. Assim, as concentrações correspondem a 0,2-20 µg de metoprolol /mL de urina e 0,1-10 µg de  $\alpha$ -hidroximetoprolol/mL de urina.

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

### 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 nebivolol racêmico foram analisados com base no modelo bicompartimental com *lag time* (modelo 12).

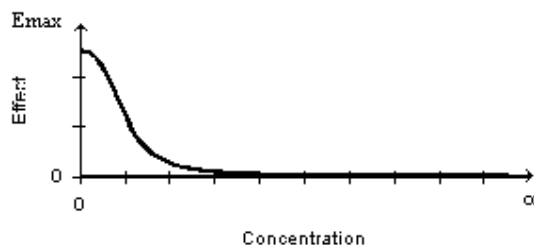
### 3.6 Análise farmacocinética-farmacodinâmica

A análise farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD), empregando o programa WinNonlin versão 4,0, foi realizada utilizando as concentrações plasmáticas do *d*-nebivolol como parâmetro farmacocinético e as medidas da variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico como parâmetro farmacodinâmico.

O efeito do nebivolol foi calculado como a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao exercício isométrico durante 2 min com o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima, realizado em diferentes tempos (0-48 h) após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. O efeito do nebivolol na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico foi avaliado de acordo com o estudo de Kubo et al.; 2001.

A análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função do efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico, foi descrita pelo modelo Emax sigmóide inibitório ( $E = E_{max} * (1 - (C^{**Gamma} / (C^{**Gamma} + EC50^{**Gamma})))$ ), o qual assume que o aumento da concentração plasmática do *d*-nebivolol reduz a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico, ou seja, a variação da frequência cardíaca é zero quando a concentração = infinito e na concentração zero a variação da frequência cardíaca = Emax.

#### Sample Graph



Os parâmetros avaliados incluem o Emax como o efeito máximo de variação na frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico, o EC50 como a concentração plasmática de *d*-nebivolol que resulta em 50% do Emax e pelo gama que descreve a inclinação da curva.

### **3.7 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 de neбиволол diferentes da unidade foi empregado o teste de Wilcoxon bicaudal. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi fixado em 5%.

## *4 Resultados*

#### 4.1 Características dos voluntários sadios investigados

Os dados demográficos dos voluntários investigados estão apresentados na Tabela 1 e no ANEXO 3 (Tabelas i e ii) como valores individuais. A idade variou entre 21 a 41 anos e o IMC entre 21,5 a 27,4 Kg/m<sup>2</sup>.

**Tabela 1:** Características individuais dos voluntários sadios investigados (n=15)

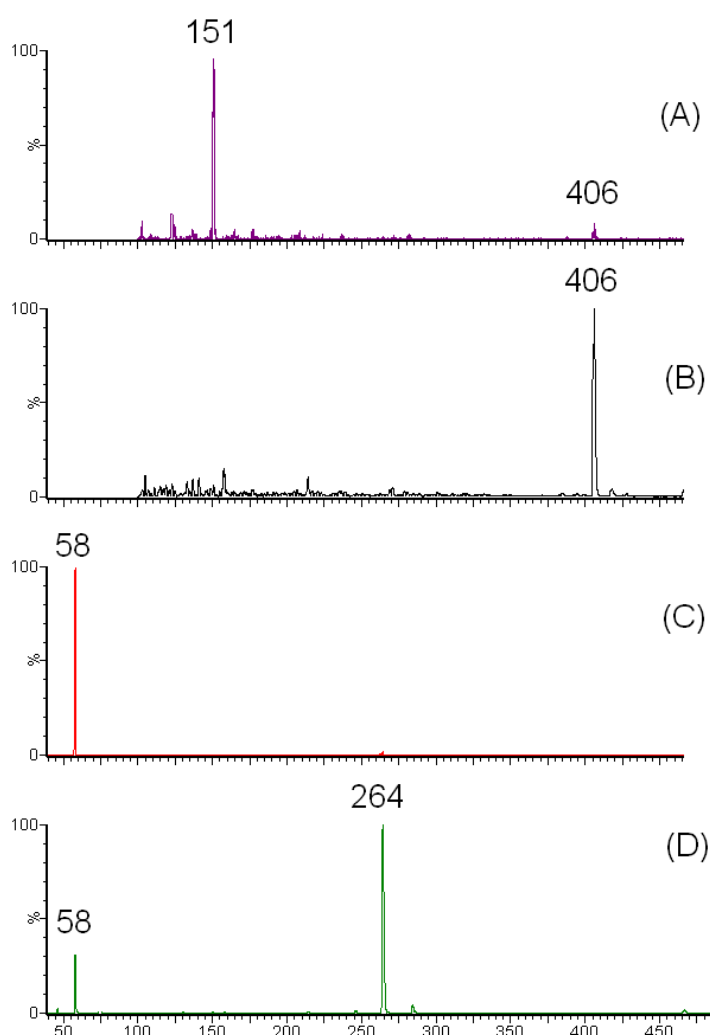
Voluntários	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
1	F	29	59,3	1,58	23,8
2	F	41	62,9	1,66	22,8
3	M	34	65	1,73	21,7
4	M	30	75,4	1,75	24,6
5	F	25	71,6	1,67	25,7
6	F	30	62,5	1,68	22,1
7	M	30	64	1,64	23,8
8	M	21	75,8	1,88	21,5
9	M	27	89	1,80	27,4
10	M	26	93	1,88	26,3
11	M	26	65,8	1,71	22,5
12	M	30	73,6	1,74	24,3
13	M	27	65	1,68	23,0
14	F	29	59,9	1,71	20,5
15	M	29	68	1,70	23,5

Os voluntários investigados mostram parâmetros bioquímicos dentro dos limites da normalidade para as funções renal e hepática. Os parâmetros bioquímicos estão apresentados no ANEXO 4 (Tabelas i) como valores individuais.

#### 4.2 Análise do neбивolol em plasma empregando LC-MS/MS

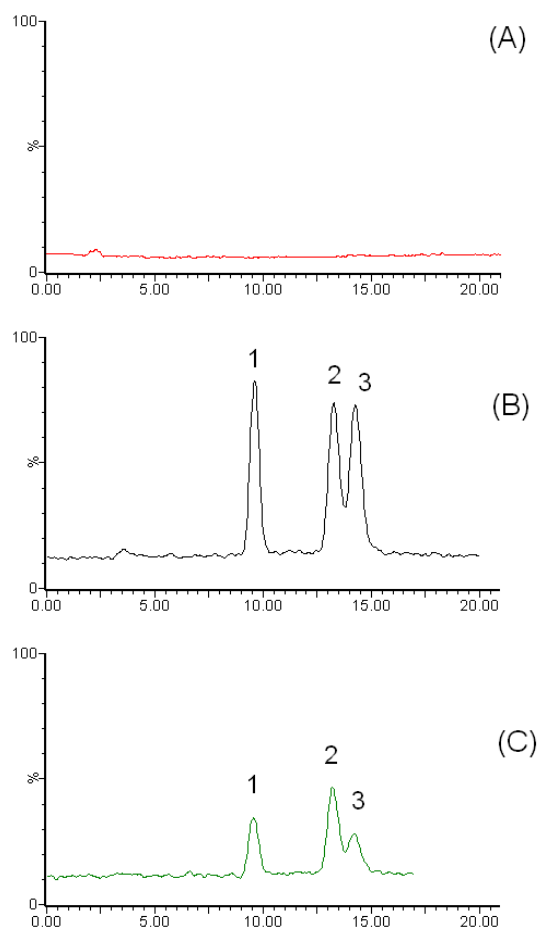
A Figura 4 mostra os íons protonados  $[M + H]^+$  e seus respectivos íons produtos monitorados nas transições 406>151 para o neбивolol e 264>58 para o PI tramadol.





**Figura 4:** Espectro de massas do íon produto do nebivolol (A), íon molecular protonado do nebivolol (B), íon produto do tramadol (C) e do íon molecular protonado do tramadol (D).

A Figura 5 apresenta os cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebivolol em plasma humano (2500 pg de cada isômero/mL) enriquecido com nebivolol racêmico.



**Figura 5:** Cromatogramas referentes à análise dos isômeros do nebulolol em plasma. (A) Plasma humano branco; (B) Plasma humano enriquecido com nebulolol racêmico (2500 pg de cada isômero/mL) e padrão interno tramadol (3125 pg/mL) e (C) Plasma de voluntário sadio obtido 1 h após a administração de dose única de 10 mg de nebulolol racêmico. Picos 1- padrão interno (tramadol), 2- *l*-nebulolol, 3- *d*-nebulolol.

Os dados referentes a avaliação do efeito matriz na análise dos isômeros do nebulolol e do PI tramadol em plasma estão apresentados na Tabela 2 como a porcentagem em relação ao sinal original. Os dados estão apresentados como a média dos valores obtidos para quatro diferentes lotes de plasma.

**Tabela 2:** Efeito matriz na análise dos isômeros do nebulolol e PI em quatro diferentes lotes de plasma humano. Os dados estão apresentados como média.

Concentração (pg/mL)	Efeito Matriz (% em relação ao sinal original )		
	<i>l</i> -nebulolol	<i>d</i> -nebulolol	PI
40	94,27	99,68	94,28
1000	85,59	85,86	
2000	90,24	92,41	

#### 4.2.1 Validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma

As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos na validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.

**Tabela 3:** Parâmetros de validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma.

	<i>l</i> -nebivolol	<i>d</i> -nebivolol
<b>Recuperação absoluta (%)</b>		
40 pg/mL	94,58	99,22
1000 pg/mL	97,26	96,68
2000 pg/mL	94,78	93,99
<b>Linearidade (pg/mL)</b>	25 – 2500	25 – 2500
Equação da reta	$y=0,0002x+0,001278$	$y=0,0001x+0,001149$
Coefficiente de correlação linear	$r = 0,997$	$r = 0,998$
<b>Limite de Quantificação (pg/mL)</b>	25	25
Precisão (CV %, n = 10)	7,05	8,08
Exatidão (Inexatidão %)	0,02	0,07
<b>Precisão intercorridas (CV %)</b>		
40 pg/mL ( n=5)	8,73	12,06
1000 pg/mL ( n=5)	7,94	8,81
2000 pg/mL ( n=5)	7,63	4,62
<b>Precisão intra-corrida (n=10; CV %)</b>		
40 pg/mL ( n=10)	10,91	5,06
1000 pg/mL ( n=10)	12,16	8,74
2000 pg/mL ( n=10)	4,03	5,71
<b>Exatidão intercorridas (Inexatidão %)</b>		
40 pg/mL ( n=5)	5,83	0,26
1000 pg/mL ( n=5)	-2,54	-1,54
2000 pg/mL ( n=5)	-11,23	-8,17
<b>Exatidão intra-corrida (n=10; Inexatidão %)</b>		
40 pg/mL ( n=10)	-2,20	-5,08
1000 pg/mL ( n=10)	-3,46	0,08
2000 pg/mL ( n=10)	-11,08	-3,80

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/ média) x 100]; % Inexatidão =  $[(C_{obs}-C_{adicionada})/C_{adicionada}] \times 100$ .

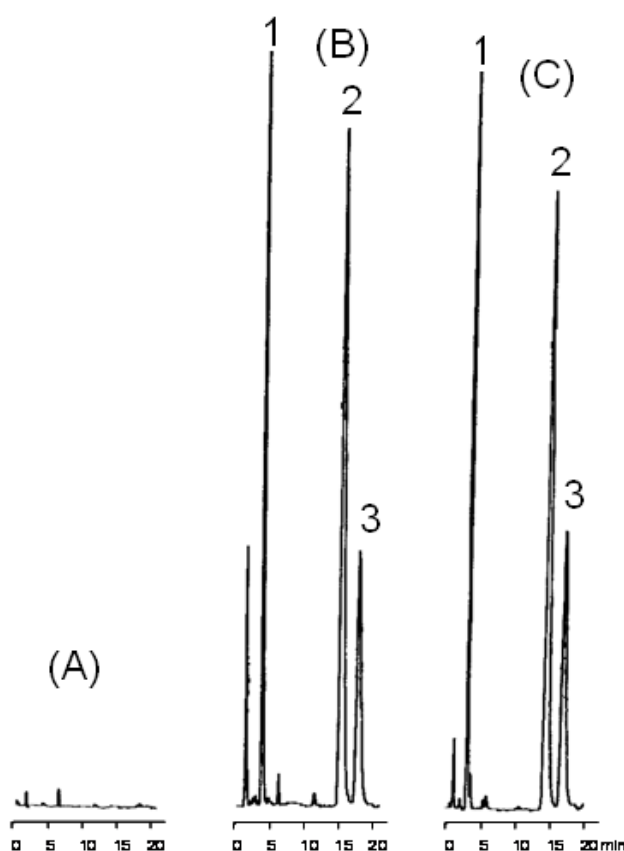
**Tabela 4:** Estudo de estabilidade dos isômeros do nebivolol em plasma.

Desvio (%)	<i>l</i> -nebivolol	<i>d</i> -nebivolol
<b>Curta duração (4 h)</b>		
40 pg/mL	2,96	-10,13
2000 pg/mL	5,76	-5,34
<b>Ciclos congelamento/descongelamento</b>		
40 pg/mL	-14,17	-6,40
2000 pg/mL	-14,81	-13,82
<b>Pós-processamento (12h)</b>		
40 pg/mL	4,28	0,98
2000 pg/mL	-13,25	-14,44

% desvio em relação às amostras recém preparadas.

### 4.3 Análise do metoprolol e $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina

A Figura 6 mostra os cromatogramas referentes à análise do metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina empregando HPLC com detecção por fluorescência.



**Figura 6:** Cromatogramas referente à análise do metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina. (A) Urina branco; (B) Urina enriquecida com metoprolol,  $\alpha$ -hidroximetoprolol e padrão interno tramadol; (C) Urina coletada no período de 0-8h após a administração de 100 mg de tartarato de metoprolol. 1- $\alpha$ -hidroximetoprolol, 2-tramadol e 3-metoprolol

### 4.3.1 Fenótipo oxidativo tipo metoprolol

Os resultados da investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol estão apresentados na Tabela 5. As razões metabólicas de concentrações urinárias metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol foram obtidas da urina coletada até 8 horas após a administração de dose única de 100 mg do fármaco marcador tartarato de metoprolol. A razão de excreção urinária metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol menor ou igual a 12,6 ( $\log$  metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol  $>$  1,10) é definida como o fenótipo de metabolizador extensivo (HORAI et al., 1990).

**Tabela 5:** Investigação do fenótipo oxidativo tipo metoprolol (n=15)

Voluntário	razões metabólicas em urina metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol	Fenótipo
1	1,20	EM
2	0,62	EM
3	1,15	EM
4	0,43	EM
5	0,81	EM
6	1,24	EM
7	0,49	EM
8	0,53	EM
9	3,24	EM
10	0,85	EM
11	3,00	EM
12	1,30	EM
13	0,85	EM
14	20,12	PM
15	16,67	PM

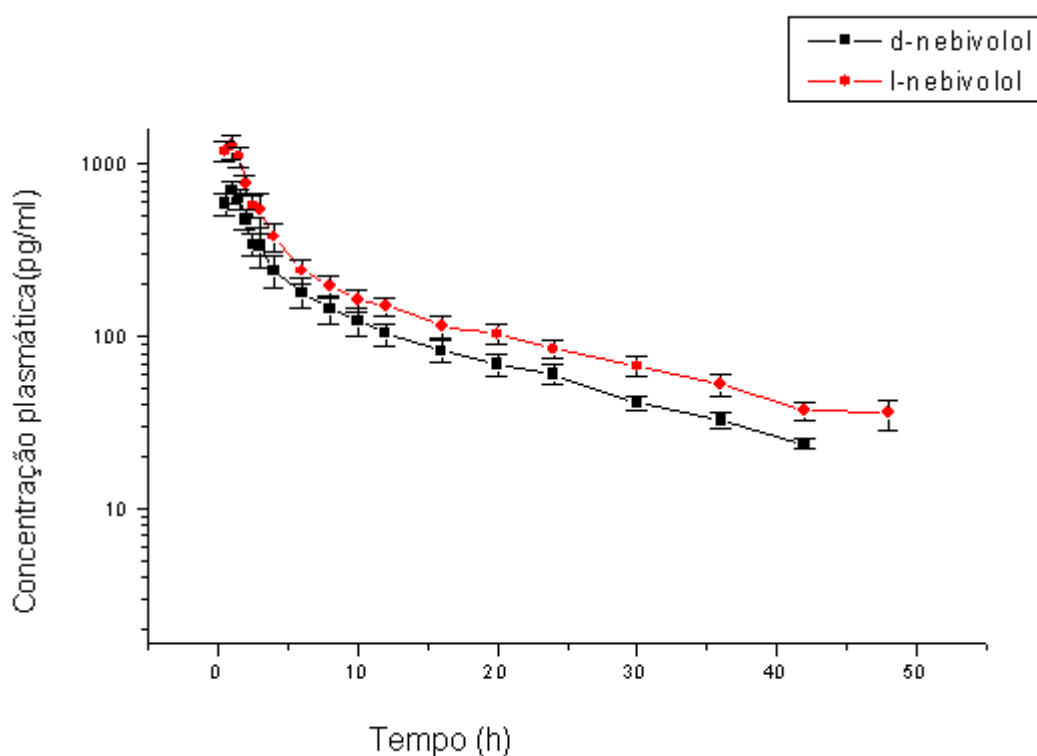
EM=metabolizador extensivo

PM=metabolizador lento

#### 4.4 Farmacocinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios

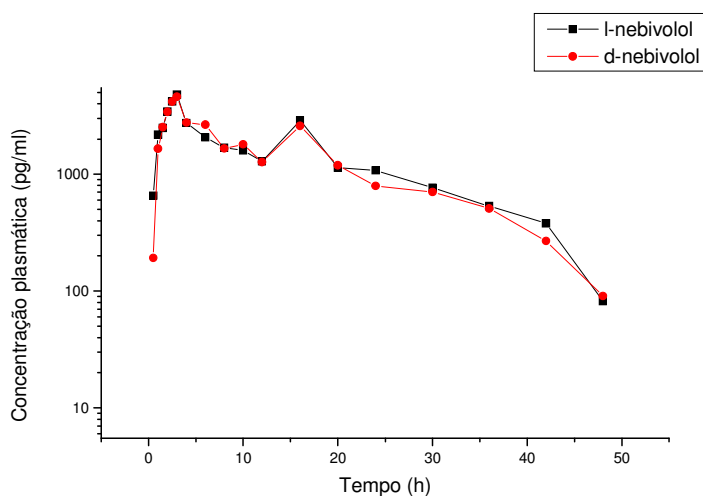
A disposição cinética dos isômeros do nebivolol foi avaliada em 15 voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico.

As curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo obtidas para os voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 estão apresentadas na Figura 7, como média e erro padrão da média (n=13).

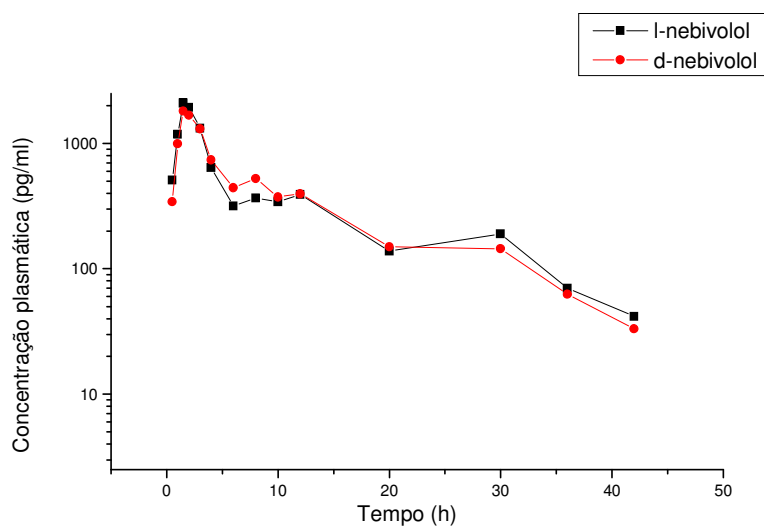


**Figura 7:** Curva de concentração plasmática *versus* tempo dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13). Os dados estão expressos como média e erro padrão da média.

A curvas de concentrações plasmáticas dos isômeros do nebivolol *versus* tempo obtidas para os voluntários fenotipados como metabolizadores lentos do CYP2D6 (n=2) estão apresentadas nas Figuras 8 e 9 como dados individuais.

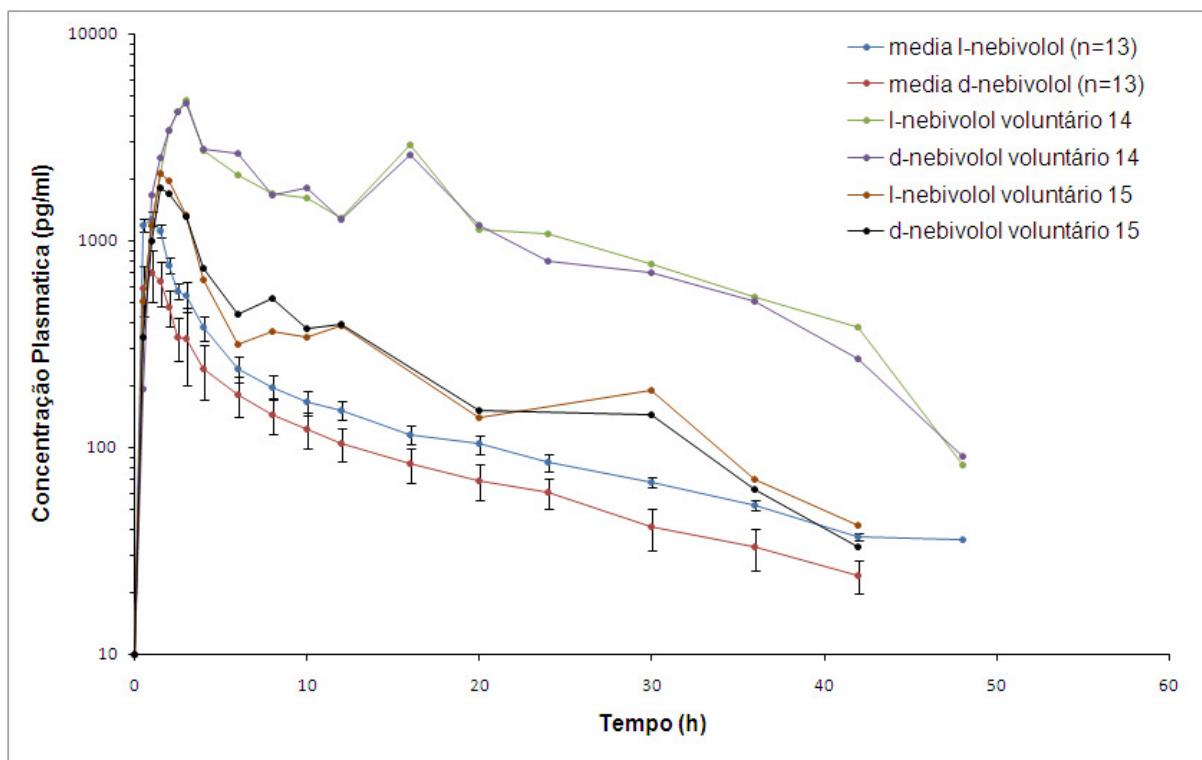


**Figura 8:** Curvas concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo referentes ao voluntário 14 fenotipado como metabolizador lento do CYP2D6 (razão metabólica metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina= 20,12) e tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.



**Figura 9:** Curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo referentes ao voluntário 15 fenotipado como metabolizador lento do CYP2D6 (razão metabólica metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol em urina= 16,62) e tratado com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

A figura 10 apresenta em um mesmo gráfico as curvas concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo para os 13 voluntários sadios classificados como metabolizadores extensivos (média e erro padrão da média) e para os 2 voluntários sadios classificados como metabolizadores lentos do CYP2D6 (dados individuais).



**Figura 10:** Curvas concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo obtidas para os voluntários sadios metabolizadores extensivos (n=13, média e erro padrão da média) e metabolizadores lentos (n=2, dados individuais). Todos os voluntários sadios foram tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol para os voluntários sadios classificados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (n=13) está apresentada na Tabela 6 como mediana, média e intervalo de confiança 95%. Os dados para os voluntários individuais estão apresentados no ANEXO 3 (Tabelas i-ii).



**Tabela 6:** Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios classificados como metabolizadores extensivos do CYP2D6 (n=13) e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Os valores estão expressos como mediana, média (IC 95%).

<b>Parâmetro</b>	<b><i>l</i>-nebivolol</b>	<b><i>d</i>-nebivolol</b>
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	1,46 1,45(1,10-1,80)	0,79* 0,77(0,58-0,96)
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	0,94 0,86(0,66-1,05)	0,99 0,97(0,83-1,12)
<b>AUC<sup>0-∞</sup> (ng.h/mL)</b>	6,45 7,62(5,68-9,55)	3,99* 4,91(3,68-6,15)
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	14,85 14,61(11,85-17,36)	11,90 14,79(10,26-19,32)
<b>α (h<sup>-1</sup>)</b>	0,98 1,27(0,66-1,87)	1,52 1,61(0,89-2,33)
<b>β(h<sup>-1</sup>)</b>	0,047 0,053(0,041-0,065)	0,053 0,057(0,042-0,073)
<b>Vd/f (L)</b>	10936 11667(8267-15067)	19082* 23869(8195-39543)
<b>Cl/f (L/h)</b>	774,51 798,91(544,65-1053,20)	1252,70* 1193,50(878,93-1508,10)
<b>AUC<sup>0-∞</sup> /d</b>		1,41 1,42 (1,04-1,80)

Vd/f= calculado como a soma do V1/f (volume do compartimento central) e V2/f (volume do compartimento periférico); \* Teste de Wilcoxon, bicaudal para dados pareados, p<0,05

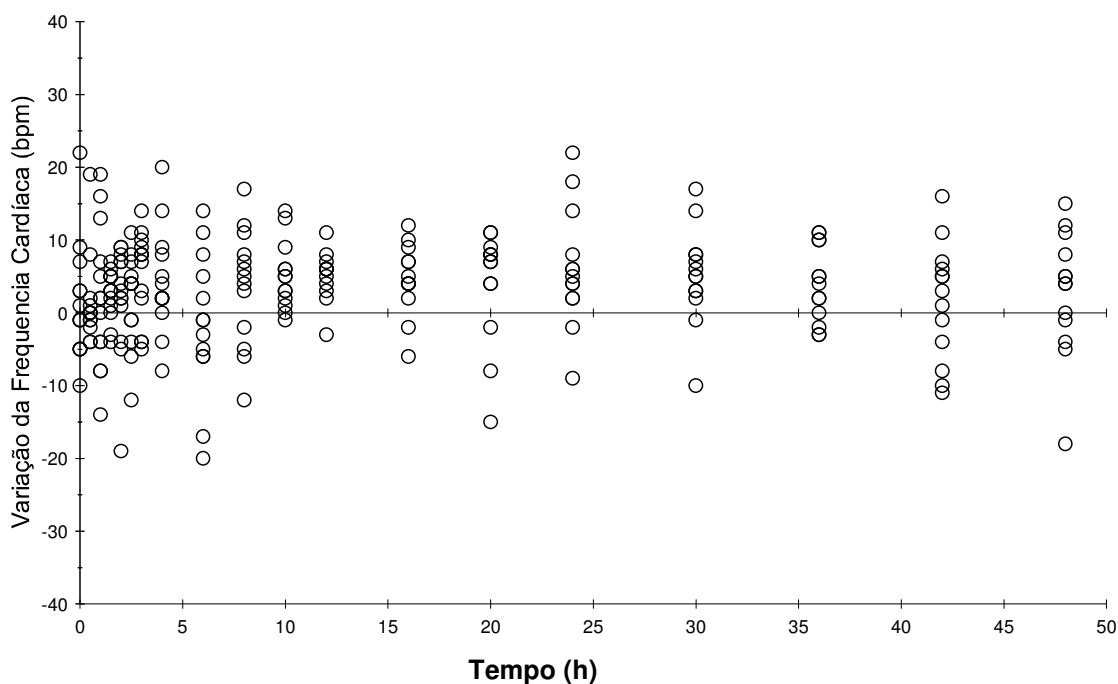
A Tabela 7 mostra a disposição cinética dos isômeros do nebivolol referentes aos dois voluntários (voluntários 14 e 15) classificados como metabolizadores lentos do CYP2D6.

**Tabela 7:** Disposição cinética dos isômeros do nebivolol em voluntários sadios classificados como metabolizadores lentos do CYP2D6 (n=2) e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico. Dados individuais referentes aos voluntários 14 e 15.

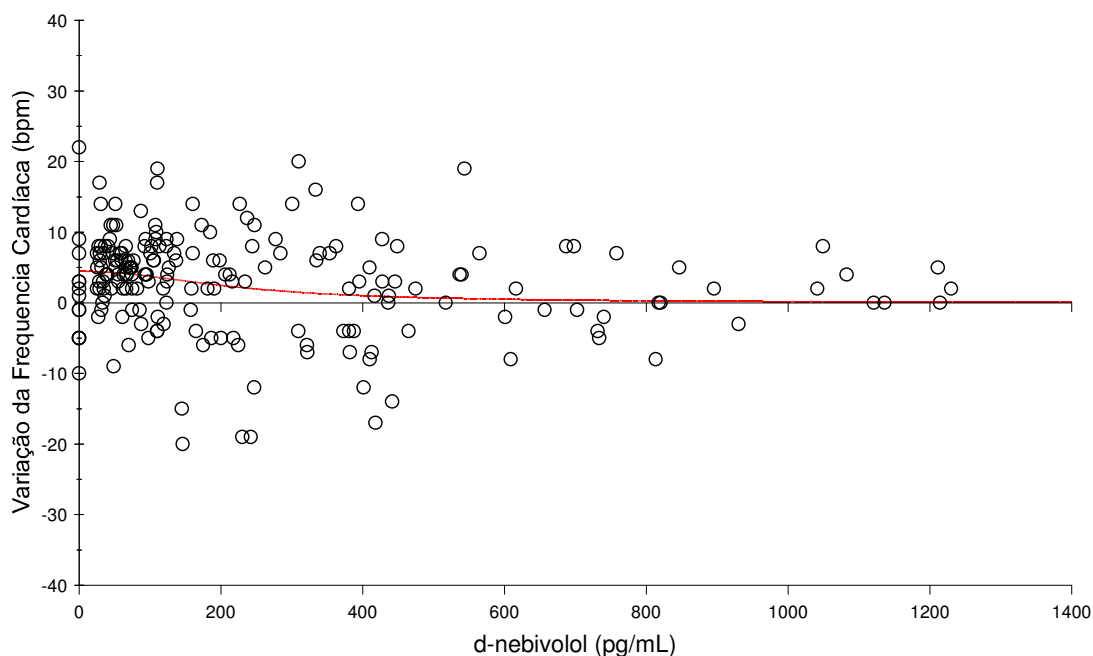
Parâmetro	Voluntário 14		Voluntário 15	
	<i>l</i> -nebivolol	<i>d</i> -nebivolol	<i>l</i> -nebivolol	<i>d</i> -nebivolol
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	3,87	3,70	2,21	1,86
<b>t<sub>max</sub> (h)</b>	2,55	2,50	1,60	1,60
<b>AUC<sup>0-∞</sup> (ng.h/mL)</b>	57,45	61,83	14,26	14,5
<b>t<sub>1/2β</sub> (h)</b>	15,0	12,0	10,0	14,0
<b>α (h<sup>-1</sup>)</b>	0,62	0,61	1,23	1,28
<b>β(h<sup>-1</sup>)</b>	0,04	0,04	0,05	0,04
<b>Vd/f (L)</b>	772,0	925,0	3864,30	5320,77
<b>Cl/f (L/h)</b>	87,00	81,00	350,0	344,0
<b>AUC<sup>0-∞</sup> l/d</b>	0,93		0,98	

#### 4.5. Farmacocinética-farmacodinâmica do nebivolol

A análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função do efeito na frequência cardíaca, foi descrita pelo modelo Emax sigmóide inibitório ( $E = E_{max} * (1 - (C^{**Gamma} / (C^{**Gamma} + EC50^{**Gamma})))$ ), o qual assume que o aumento da concentração plasmática do *d*-nebivolol reduz a variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico (Figuras 11 e 12). Os parâmetros avaliados incluem o Emax como o efeito máximo de variação na frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico, o EC50 como a concentração plasmática de *d*-nebivolol que resulta em 50% do Emax e pelo gama que descreve a inclinação da curva (Tabela 8).



**Figura 11:** Curvas de variação da frequência cardíaca *versus* tempo para os voluntários saudáveis fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13).



**Figura 12:** Análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função do efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico (modelo Emax sigmóide inibitório) em voluntários saudáveis fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13).

**Tabela 8:** Parâmetros obtidos na análise PK-PD relacionando as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em função do efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico (modelo  $E_{max}$  sigmóide inibitório) em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico (n=13).

	Média	IC 95%	CV (%)
$E_{max}$ (bpm)	4,47	1,37 - 7,57	24,74
EC50 (pg/mL)	222,16	96,29 - 540,60	51,15
Gamma	2,07	2,97 - 7,10	86,87

CV = (desvio padrão / média) x 100

## *5 Discussão*

O presente estudo avalia a farmacocinética dos isômeros do nebivolol e a relação farmacocinética - farmacodinâmica em voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico. O estudo exigiu o desenvolvimento e a validação de um método analítico enantiosseletivo empregando LC-MS/MS com sensibilidade para quantificar os isômeros do nebivolol em concentrações tão baixas quanto 25 pg/mL de plasma.

A farmacocinética dos isômeros do nebivolol foi inicialmente descrita em pacientes hipertensos tratados durante 4 semanas com 5mg/dia de nebivolol racêmico. Os isômeros do nebivolol foram quantificados nas amostras de plasma empregando como método analítico radioimunoensaio estereoespecífico, o qual sem extração não discrimina o fármaco inalterado dos seus metabólitos hidroxilados, apresentando limite de detecção de 1 ng/mL de plasma. Os autores relatam que a concentração plasmática máxima (C<sub>max</sub>) do *l*-nebivolol mais os metabólitos hidroxilados é maior do que a do *d*-nebivolol mais os metabólitos hidroxilados, com valores respectivamente de 13,1 e 7,3 ng/mL após a primeira dose e 19,0 e 9,1 ng/mL após quatro semanas de tratamento (HIMMELMANN et al.; 1996).

Outros autores também avaliam a enantiosseletividade na farmacocinética do nebivolol em voluntários sadios e em pacientes obesos empregando extração e radioimunoensaio estereoespecífico (isômeros do nebivolol) e HPLC com detecção por fluorescência (nebivolol inalterado como mistura isomérica). Os valores de AUC reportados foram próximos para o *l*-nebivolol e para o *d*-nebivolol (47,8 vs 48,0 ng.h/mL para voluntários sadios e 38,3 vs 36,7 ng.h/mL para pacientes obesos) (CHEYMOL et al.; 1997). Lefebvre et al. (2006) empregando extração e radioimunoensaio estereoespecífico também relatam valores próximos para as concentrações plasmáticas máximas do *l*-nebivolol e *d*-nebivolol (0,48 vs 0,57 ng/mL) em pacientes hipertensos tratados com dose única oral de 5 mg do fármaco racêmico.

A farmacocinética dos isômeros do nebivolol também foi avaliada em voluntários sadios tratados com doses diárias de 10 mg de nebivolol racêmico durante 21 dias, associado ou não com doses diárias de 20 mg de fluoxetina. Os autores relatam que os isômeros do nebivolol foram quantificados nas amostras de plasma empregando LC-MS/MS com limite de quantificação de 40 pg de cada isômero/mL de plasma. No entanto, não há descrição ou qualquer referência relativa a metodologia empregada. Ressalta-se ainda que os parâmetros farmacocinéticos

do referido estudo encontram-se descritos apenas para o nebivolol como mistura isomérica e apenas uma figura mostra as concentrações plasmáticas dos isômeros do nebivolol em função do tempo. Na situação de monoterapia, as concentrações plasmáticas máximas observadas após a administração de 10 mg de nebivolol racêmico a voluntários sadios foram de aproximadamente 0,7 ng/mL para o *d*-nebivolol e 1,3 ng/mL para o *l*-nebivolol (LINDAMOOD et al.; 2010).

A separação dos isômeros do nebivolol em coluna de fase quiral foi até então relatada apenas por Hassan et al. (2001). Os autores usaram colunas com fases de amilose carbamato (Chiralpak<sup>®</sup> AD e Chiralpak<sup>®</sup> AD-RH) empregando metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol e 1-butanol como fases móveis. Os isômeros foram eluídos na sequência *d*-nebivolol e *l*-nebivolol com as fases móveis metanol, etanol e 1-propanol e na sequência inversa com as fases móveis 2-propanol e 1-butanol.

O presente estudo reporta pela primeira vez o desenvolvimento e a validação do método de análise dos isômeros do nebivolol em plasma empregando LC-MS/MS com coluna de fase estacionária quiral.

A separação dos isômeros do nebivolol foi realizada na coluna Chirobiotic<sup>®</sup> V (Sigma-Aldrich), com partículas de 5 µm (250 x 4,6 mm) empregando a fase móvel metanol:ácido acético:dietilamina (100:0,15:0,05 v/v/v) com fluxo de 1 mL/min a 24°C. A resolução dos isômeros do nebivolol com tempo de corrida de aproximadamente 15 min está apresentada na Figura 5. A ordem de eluição dos isômeros na sequência *l*-nebivolol e *d*-nebivolol foi estabelecida com base em estudos anteriores que reportam maiores concentrações plasmáticas do *l*-nebivolol quando comparado ao *d*-nebivolol (HIMMELMANN et al.; 1996; LINDAMOOD et al.; 2010).

O método desenvolvido foi avaliado quanto ao efeito matriz, considerando que os componentes endógenos do plasma podem resultar em supressão ou aumento do sinal no sistema LC-MS/MS. O efeito matriz foi avaliado comparando os cromatogramas obtidos da injeção de soluções padrão de nebivolol e padrão interno tramadol em fase móvel com os cromatogramas obtidos da injeção das referidas soluções padrão em extratos de plasma branco oriundos de quatro diferentes voluntários. Os dados apresentados na Tabela 2 indicam que o efeito matriz é praticamente ausente na análise dos isômeros do nebivolol e do padrão interno tramadol. Os dados mostram valores acima de 85% 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 branco.

Os isômeros do nebivolol foram extraídos do plasma humano em meio alcalino empregando éter di-isopropílico:diclorometano (70:30, v/v) como solvente extrator. A recuperação (Tabela 3) mostra valores acima de 90% para ambos os isômeros do nebivolol. Ramakrishna et al. (2005) relatam recuperação de  $73,4 \pm 3,7\%$  do nebivolol plasmático como mistura isomérica empregando como solvente extrator a mistura éter-dietílico:diclorometano (70:30, v/v). Selvan et al. (2007) mostram recuperações de aproximadamente 85% do nebivolol plasmático como mistura isomérica empregando precipitação protéica com acetonitrila.

O método desenvolvido mostrou linearidade no intervalo de concentrações plasmáticas de 25-2500 pg de cada isômero/mL (coeficientes de correlação maiores que 0,99); Tabela 3. O limite de quantificação de 25 pg/mL de plasma (Tabela 3) permitiu a análise dos isômeros do nebivolol até 48 h após a administração de dose única de 10 mg de nebivolol racêmico. Logo, o presente método enantiosseletivo pode ser relatado como o mais sensível até então desenvolvido. O estudo de Lindamood et al. (2010) empregando LC-MS/MS relata limite de quantificação de 40 pg de cada isômero /mL, enquanto os métodos que empregam radioimunoensaio e que não distinguem o fármaco inalterado dos metabólitos hidroxilados reportam limites de detecção de 1 ng /mL de plasma (HIMMELMANN et al., 1996) ou de 0,1 ng/mL de plasma (CHEYMOL et al., 1007). Ressalta-se ainda que os métodos que empregam LC-MS/MS descritos na análise do nebivolol em plasma como mistura isomérica relatam limites de quantificação de 50 pg/mL na análise de alíquotas de 500  $\mu$ L de plasma (RAMAKRISHNA et al.; 2005) ou de 10 pg/mL na análise de alíquotas de 200  $\mu$ L de plasma (SELVAN et al.; 2007).

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e inexatidão intra e inter-corridas (Tabelas 3) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. O nebivolol demonstrou estabilidade em plasma humano durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4 h em temperatura ambiente e após o processamento durante 12 h no auto-injetor a 5<sup>o</sup>C, já que foram revelados desvios inferiores a 15% (Tabela 4).

A disposição cinética dos isômeros do nebivolol foi avaliada em 15 voluntários sadios após a administração de dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.



O metabolismo do nebivolol é dependente da atividade do CYP2D6. As concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio do *d*-nebivolol e do *l*-nebivolol, respectivamente são 10 e 15 vezes maiores em metabolizadores lentos quando comparados com metabolizadores extensivos para o CYP2D6 (LEFEBVRE et al., 2006). Logo, os voluntários sadios investigados foram fenotipados quanto a atividade do CYP2D6 empregando metoprolol como fármaco marcador.

Os voluntários investigados foram tratados com dose única oral de 100 mg de tartarato de metoprolol após 48 h da administração do nebivolol. A urina foi coletada até 8 h após a administração do metoprolol. As concentrações urinárias de metoprolol e  $\alpha$ -hidroximetoprolol foram determinadas por HPLC com detecção por fluorescência, como mostra o cromatograma apresentado na Figura 6, obtido de acordo com estudo anterior do grupo (NEVES, 2009). As razões metabólicas de concentrações urinárias metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol inferiores a 12,6 designam o fenótipo de metabolizador extensivo para o CYP2D6 (HORAI et al., 1990). As razões metabólicas de concentrações urinárias metoprolol/ $\alpha$ -hidroximetoprolol apresentadas na Tabela 5 mostram valores entre 0,4 a 3,2 e portanto compatíveis com o fenótipo de metabolizador extensivo para 13 voluntários e valores entre 16 a 20 para 2 voluntários (voluntários 14 e 15) classificados como metabolizadores lentos para o CYP2D6.

As curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo para os voluntários metabolizadores extensivos (n= 13) estão apresentadas na Figura 7. As concentrações plasmáticas de ambos os isômeros do nebivolol foram quantificadas até 48 h após a administração de dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico (limites de quantificação de 25 pg de cada isômero/mL de plasma). As curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo em metabolizadores extensivos permitem inferir maiores concentrações plasmáticas do *l*-nebivolol quando comparado ao *d*-nebivolol. As razões isoméricas de área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ( $AUC_l / AUC_d$ ) mostram valores de 1,41 (mediana, Tabela 6).

As curvas de concentração plasmática dos isômeros do nebivolol *versus* tempo para os voluntários fenotipados como metabolizadores lentos para o CYP2D6 (voluntários 14 e 15) estão apresentadas nas Figuras 8 e 9. A análise dos dados permite inferir perda da enantiosseletividade na disposição cinética do nebivolol nos

voluntários fenotipados como metabolizadores lentos para o CYP2D6, com observações de razões isoméricas de  $AUC_l / AUC_d$  de 0,93 e 0,98, respectivamente para os voluntários 14 e 15 (Tabela 7).

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 nebivolol foi administrado aos voluntários sadios somente por via oral e não há dados da biodisponibilidade dos enantiômeros individuais do nebivolol na população investigada.

A disposição cinética do nebivolol é enantiosseletiva nos voluntários investigados fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6. Os valores de concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ( $AUC^{0-\infty}$ ), Cl/f e Vd/f mostram diferenças com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre os isômeros do nebivolol (Tabela 6).

Os maiores valores de  $AUC^{0-\infty}$  para o *l*-nebivolol em relação ao *d*-nebivolol (6,45 vs 3,99 ng.h/mL) resultam em menores valores de Cl/f (775 vs 1253 L/h). A  $C_{max}$  obtida para o isômero *l*-nebivolol é praticamente o dobro do valor obtido para o isômero *d*-nebivolol (1,46 vs 0,79 ng/ml). Os valores de Vd/f são extremamente altos para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol, respectivamente 10936 e 19082 L. A meia-vida de eliminação não mostra diferenças com significância estatística entre os isômeros (14,65 vs 11,90 h).

Os parâmetros farmacocinéticos como  $AUC^{0-\infty}$ , *clearance* e volume de distribuição para os isômeros individuais do nebivolol, empregando metodologias que separam o fármaco inalterado dos metabólitos hidroxilados, foram até então descritos apenas por Cheymol et al. (1997) na investigação de voluntários sadios e pacientes obesos fenotipados como metabolizadores extensivos e tratados com dose única intravenosa (0,073 mg/Kg de peso corporal ideal) de nebivolol racêmico.

Os autores não mostram enantiosseletividade na disposição cinética do nebivolol em voluntários sadios tratados com nebivolol por via intravenosa em função da obtenção de valores similares de AUC (47,8 vs 48,0  $\mu$ g.L/h), Cl (48,6 vs 48,4 L/h) e Vd (599 vs 739 L), respectivamente apresentados para os isômeros *d*-nebivolol e *l*-nebivolol. Logo, a enantiosseletividade observada na presente

investigação de voluntários sadios metabolizadores extensivos tratados com dose única oral de nebivolol racêmico é conseqüente da eliminação pré-sistêmica.

A farmacocinética do nebivolol como mistura isomérica foi descrita por Lindamood et al. (2010) na investigação de voluntários sadios tratados com dose múltiplas oral de 10mg/dia de nebivolol racêmico como monoterapia ou em associação com outros fármacos tais como hidroclorotiazida, furosemida, ramipril, digoxina, warfarina, losartam e fluoxetina. Os valores de Cl/f descritos para o nebivolol como mistura isomérica variam de 585 – 787 L/h em voluntários sadios fenotipados como metabolizadores extensivos para o CYP2D6 e tratados com nebivolol oral em monoterapia. Os valores de Cl/f apresentados por Lindamood et al. (2010) para o nebivolol como mistura isomérica são próximos aos valores obtidos na presente investigação de 775 e 1253 L/h, respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol, os quais inferem eliminação pré-sistêmica preponderante para o isômero *d*-nebivolol.

Os valores de Vd/f obtidos no presente estudo (10936 e 19082 L respectivamente para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol) são comparáveis com aqueles apresentados como mistura isomérica por Lindamood et al. (2010) na investigação de voluntários sadios tratados por via oral com doses múltiplas de nebivolol racêmico (11467 a 16160 L). Os maiores valores de Vd/f para o isômero *d*-nebivolol podem ser explicados em função de diferenças na biodisponibilidade entre os isômeros individuais do nebivolol, considerando que na administração intravenosa de nebivolol a voluntários metabolizadores extensivos (CHEYMOL et al.; 1997), os valores de Vd são maiores para o *l*-nebivolol do que para o *d*-nebivolol (739 vs 599 L), provavelmente em função de diferenças entre os isômeros na ligação às proteínas plasmáticas ( $98,0 \pm 0,3\%$  para o *l*-nebivolol e  $98,1 \pm 0,2\%$  para o *d*-nebivolol) e na distribuição para os eritrócitos (51% para o *l*-nebivolol e 46% para o *d*-nebivolol).

Os parâmetros farmacocinéticos para os isômeros individuais do nebivolol obtidos para os voluntários sadios metabolizadores lentos para o CYP2D6 (voluntários 14 e 15) estão apresentados na Tabela 7. Os dados permitem inferir perda da enantiosseletividade nos parâmetros AUC (57,5 vs 61,8 e 14,26 vs 14,5 ng.h/mL), Cmax (3,87 vs 3,70 e 2,21 vs 1,86 ng/mL) e Cl/f (87 vs 81 e 350 vs 344 L/h), apresentados respectivamente para os isômeros *l*-nebivolol e *d*-nebivolol e referentes aos voluntários 14 e 15. Os valores de Cl/f para os metabolizadores lentos (87 vs 81 e 350 vs 344 L/h; Tabela 7) são muito menores que aqueles relatados para

os metabolizadores extensivos para o CYP2D6 (775 vs 1253 L/h respectivamente para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol; Tabela 6). A biodisponibilidade oral do nebivolol em metabolizadores extensivos é de 12%, enquanto em metabolizadores lentos para o CYP2D6 é de aproximadamente 96% (VAN PEER et al.; 1991). O Cl/f do nebivolol como mistura isomérica relatado por Lindamood et al. (2010) na investigação de 3 voluntários sadios metabolizadores lentos para o CYP2D6 e tratados com doses múltiplas oral de nebivolol é de 14 L/h. A perda da enantiosseletividade nos valores de Cl/f para os metabolizadores lentos permite sugerir que diferentes enzimas estão envolvidas no metabolismo dos isômeros individuais do nebivolol. Cheymol et al. (1997) observam que na administração intravenosa os valores de *clearance* entre os isômeros do nebivolol não diferem para os metabolizadores extensivos, mas diferem para os metabolizadores lentos, com observações de maiores valores para o *d*-nebivolol (8,6 vs 22,3 L/h), e que portanto o metabolismo do *l*-nebivolol é mais dependente do CYP2D6 do que o metabolismo do *d*-nebivolol.

Em relação aos valores de Vd/f para os metabolizadores lentos tratados com dose única oral de nebivolol racêmico, os dados apresentados na Tabela 7 mostram maiores valores para o *l*-nebivolol (772 vs 3864,30 e 925 vs 5320,77 L, respectivamente para os voluntários 14 e 15; Tabela 7) quando comparado ao *d*-nebivolol. Os menores valores de Vd/f obtidos para os metabolizadores lentos quando comparados aos metabolizadores extensivos (10936 e 19082 L, respectivamente para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol; Tabela 6) podem ser atribuídos ao aumento da biodisponibilidade para os metabolizadores lentos. Os dados ainda permitem observar que os valores de Vd/f são maiores para o *d*-nebivolol nos metabolizadores extensivos e maiores para o *l*-nebivolol nos metabolizadores lentos, provavelmente em função de diferenças na biodisponibilidade entre os isômeros individuais do nebivolol.

A farmacodinâmica do nebivolol foi avaliada empregando como parâmetro a variação da frequência cardíaca entre os períodos final e anterior ao teste de esforço isométrico durante 2 min utilizando o *handgrip* a 30% da contratilidade voluntária máxima (KUBO et al.; 2001). O exercício isométrico com o *handgrip* induz aumento da pressão arterial acompanhado por aumento da frequência cardíaca e da resistência vascular periférica na musculatura esquelética em repouso (KAMIYA, 2001). Não há dados na literatura referentes ao efeito do nebivolol na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico.

O modelo Emax sigmóide inibitório foi empregado para descrever a análise PK-PD relacionando o efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol, considerado o mais potente no bloqueio do receptor  $\beta_1$  (NUETEN & CREE, 1998).

Na análise PK-PD foram incluídos apenas os voluntários metabolizadores extensivos (n=13) em função das pronunciadas diferenças observadas nas concentrações do *d*-nebivolol entre os metabolizadores extensivos e metabolizadores lentos para o CYP2D6. Ressalta-se no entanto, que os metabólitos hidroxilados dependentes da atividade do CYP2D6 são considerados equípotentes ao *d*-nebivolol em termos do bloqueio do receptor  $\beta_1$  e que a soma do nebivolol inalterado e dos metabólitos hidroxilados é similar entre metabolizadores extensivos e metabolizadores lentos (Lefebvre et al.; 2006). Logo, os metabolizadores lentos não puderam ser incluídos na análise PK-PD em função da não disponibilidade das concentrações plasmáticas dos metabólitos hidroxilados.

A análise PK-PD relacionando o efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico em função das concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol está apresentada na Figura 12 e na Tabela 8. O modelo Emax sigmóide inibitório mostrou-se o mais adequado em função da obtenção dos menores valores de coeficientes de variação para os parâmetros Emax, EC-50 e gama. Os dados apresentados na Tabela 8 mostram valores de Emax de 4,47 bpm (IC 95% 1,37-7,57) e de EC50 de 222,16 pg/mL (IC 95% 96,29-540,60 ng/mL) para os voluntários sadios metabolizadores extensivos tratados com dose única oral do fármaco racêmico.

## *6 Conclusões*

1- O método desenvolvido e validado para a análise dos isômeros do nebivolol em plasma é sensível (limite de quantificação de 25 pg de cada isômero/mL), preciso e exato (coeficientes de variação e erros relativos < 15%), permitindo a quantificação dos isômeros do nebivolol até 48 h após a administração de dose única oral de 10 mg do fármaco racêmico a voluntários sadios.

2- A disposição cinética do nebivolol é enantiosseletiva em voluntários sadios metabolizadores extensivos para o CYP2D6, com razões isoméricas de  $AUC_I/AUC_D$  de 1,41 (n=13). Os valores de concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo ( $AUC^{0-\infty}$ ),  $Cl/f$  e  $Vd/f$  mostram diferenças com significância estatística ( $p < 0,05$ ) entre os isômeros do nebivolol

3- A disposição cinética do nebivolol não é enantiosseletiva em voluntários sadios metabolizadores lentos para o CYP2D6, com razões isoméricas de  $AUC_I/AUC_D$  de 0,93 e 0,98.

4- Os valores de  $Cl/f$  obtidos para os metabolizadores lentos (87-350 vs 81-344 L/h) são menores do que para os metabolizadores extensivos para o CYP2D6 (775 vs 1253 L/h, respectivamente para o *l*-nebivolol e *d*-nebivolol).

5- O modelo Emax sigmóide inibitório descreveu a análise PK-PD relacionando o efeito na variação da frequência cardíaca induzida pelo exercício isométrico com as concentrações plasmáticas do isômero *d*-nebivolol em voluntários sadios metabolizadores extensivos para o CYP2D6 com valores de Emax de 4,47 bpm (IC 95% 1,37-7,57) e de EC50 de 222,16 pg/mL (IC 95% 96,29-540,60 ng/mL).

## *7 Referências Bibliográficas*



BAEK, I.H.; YUN, M.H.; KWON, K.I. Pharmacokinetic/pharmacodynamic Modeling of the Cardiovascular Effects of Beta Blockers in Humans. **Arch Pharm Res.**, Korea, v.31, n.6, p.814-821, 2008.

BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: An update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm Drug Dispos.**, Chichester Wiley, v. 27, n.8, p. 387-406, 2006.

CASLAVSKA, J & THORMANN, W. Stereoselective determination of drugs and metabolites in body fluids, tissues and microsomal preparations by capillary electrophoresis (2000–2010). **J Chromatogr A.**, Switzerland, v.1218, 588-561, 2011.

CHEYMOL, G.; WOESTENBORGHES, R.; SNOECK, E.; IANUCCI, R.; LE MOING, J.P.; NADITCH, L.; LEVRON, J.C.; POIRIES, J.M. Pharmacokinetic study and cardiovascular monitoring of nebivolol in normal and obese subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v.51, n.6, p.493-498, 1997.

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, n.1, p.65-75, 1996.

DUPONT, W.D & PLUMMER, W.D. PS power and sample size program available for free on the Internet. **Controlled Clin. Trials.**, v.18, n.3, p. 274, 1997.

DUPREZ, D.; LEFEBVRE, R.; DE BACKER, T.; DE SUTTER, P.; TROUERBACH, J.; CLEMENT, D.L. Influence of nebivolol on the cardiovascular hemodynamics during postural changes and isometric exercise. **Cardiovasc Drugs Ther.**, Belgium, v.5, n.4, p.709- 717, 1991.

EVANGELISTA, S.; GARBIN, U.; FRATTA-PASINI, A.; STRANIERI, C.; BOCCIOLETTI, V.; COMINACINI, L. Effect of dl-nebivolol, its enantiomers and metabolites on the intracellular production of superoxide and nitric oxide in human endothelial cells. **Pharmacol Res.**, Italy, v. 55, n.4, p.303–309, 2007.

FUX, R.; MÖRIKE, K.; PRÖHMER, A.M.; DELABAR, U.; SCHWAB, M.; SCHAEFFELER, E.; LORENZ, G.; GLEITER, C.H.; EICHELBAUM, M.; KIVISTÖ, K.T. Impact of CYP2D6 genotype on adverse effects during treatment with metoprolol: a prospective clinical study. **Clin Pharmacol Ther.**, Germany, v. 78, n. 4, p. 378-87, 2005.

FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. **Eur J Clin Pharmacol.**, Germany, v. 63, n.4, p.321-33, 2007.

HASSAN, Y.A.E & ALI, I. Studies on the effect of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of nebivolol by HPLC. **J Biochem Biophys Methods.**, Saudi Arabia, v.48, n.2, p.175-88, 2001.

HENDRICK, J.; BOCKX, M.; ZWIJSEN, C.; BORGMANS, C.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Location of the hydroxyl functions in hydroxylated metabolites of nebivolol in different animal species and human subjects as determined by on-line high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **J Chromatogr A.**, Belgium, v.5, n.729(1-2), p.341-354, 1996.

HIMMELMANN, A.; HENDER, T.; SNOECK, E.; LUNDGREN, B.; HEDNER, J. Haemodynamic effect and pharmacokinetics of oral *d*- and *l*- nebivolol in hypertensive patients. **Eur J Clin Pharmacol.**, Germany, v.51, n. 3-4, p.259-264, 1996.

HORAI, Y.; JUNKO, T.; ISHIZAKI, T.; ISHIKAWA, K. Correlations among the metabolic ratios of three test probes (metoprolol, debrisoquine and sparteine) for genetically determined oxidation polymorphism in a Japanese population. **Br J Clin Pharmacol.**, Japan, v.29, n.1, p.111-115, 1990.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; RODRIGUEZ-ANTONA, C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safe and more effective drug therapy. **Philos Trans R Soc B Biol Sci.**, Sweden, v.360, n. 1460, p.1563-1570, 2005.

KAMIYA, A.; MICHIKAMI, D.; FU, Q.; NIIMI, Y.; IWASE, S.; MANO, T.; SUZUMURA, A. Static handgrip exercise modifies arterial baroreflex control of vascular sympathetic outflow in humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol.**, Japan, v.281, n.4, p.1134-9, 2001.

KAMALI, F.; HOWES, A.; THOMAS, S.H.L.; FORD, G.A.; SNOECK, E. A Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction study between nebivolol and the H<sub>2</sub>- receptor and ranitidine. **Br J Clin Pharmacol.**, Newcastle, v.43, n.2, p.201-204, 1997.

KROEMER, H.K.; FROMM, M.F.; EICHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. **Ther Drug Monit.**, Germany, v.18, n.4, p. 388-92, 1996.

KUBO, T.; AZEVEDO, E. R.; NEWTON, G. E.; PARKER, J. D. FLORAS, J. S. Lack of evidence for peripheral alpha(1)- adrenoceptor blockade during long-term treatment of heart failure with carvedilol. **J Am Coll Cardiol**, Canada, v. 38, n.5, p. 1463-1469, 2001

LEFEBVRE, J.; POIRIER, L.; POIRIER, P.; TURGEON, J.; LACOURCIERE, Y. The influence of CYP2D6 phenotype on the clinical response of nebivolol in patients with essential hypertension. **Br J Clin Pharmacol**, Canada, v.63, n.5, p.575-582, 2006.

LINDAMOOD, C.; ORTIZ, S.; SHAW, A.; RACKLET, R.; GORSKI, C. Effects of commonly administered agents and genetics on nebivolol pharmacokinetics drug-drug interaction studies. **J Clin Pharmacol**, USA, v.51, n.4, p.575-585, 2010.

LU, H. Stereoselectivity in drug metabolism. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, USA, v.3, n.2, p.149-158, 2007

MAFFEI, A.; VECCHIONE, C.; ARETINI, A.; POULET, R.; BETTARINI, U.; GENTILE, M. T.; CIFELLI, G.; LEMBO, G. Characterization of nitric oxide release by nebivolol and its metabolites. **Am J Hypertens**, Italy, v.19, n.6, p.579-86, 2006.

MANGRELLA, M.; ROSSE, F.; FICI, F.; ROSSI, F. Pharmacology of nebivolol. **Pharmacol res**, Italy, v.38, n.6, p.419-431, 1998.

MÉGARBANE, B.; ASLANI, A.A.; DEYE, N.; BAUD, F.J. Pharmacokinetic / pharmacodynamic modeling of cardiac toxicity in human acute overdoses: utility and limitations. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, France, v.4, n.5, p.569-579, 2008

MÜNZEL, T & GORI, T. Nebivolol: the somewhat – different beta- adrenergic receptor blocker. **J Am Coll Cardiol**, Germany, v.54, n.16, p.1491-1499, 2009.

NATION, R.L. Chirality in new drug development. Clinical pharmacokinetic considerations. **Clin. Pharmacokinet**, Adelaide, v.27, n.4, p.249-55, 1994.

NEVES, D.V. Fenotipagem do CYP2D6 em idosos cardiopatas classificados como metabolizadores extensivos ou lentos do metoprolol. 2009. 83 p. Dissertação Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

NUETEN, L.V & CREE, J.D. Nebivolol: Comparison of the Effects of dl-nebivolol, d-nebivolol, l-nebivolol, Atenolol, and Placebo on Exercise- Induced increases in Heart Rate and Systolic Blood Pressure. **Cardiovasc Drugs Ther**, Boston, v.12, n.4, p.339-344, 1998.

OIAN, X & HALL, S.D. Enantioselective effects of experimental diabetes mellitus on the metabolism of ibuprofen. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, USA, v. 274, n.3, p. 1192-98, 1995.

PAUWELS, P.J; VAN GOMPEL ,P; LEYSEN, J,E. Human beta-1 and beta-2 adrenergic receptor binding and mediated accumulation of cAMP in transfected Chinese hamster ovary cells. Profile of nebivolol and know beta- adrenergic blockers. **Biochem Pharmacol**, Belgium, v.42, n.9, p.1683-9, 1991.

PINTO, S.L.; SILVA, R.C.R.; PRIORE, S.; ASSIS, A.M.O.; PINTO, E.J. Prevalência de pré-hipertensão e de hipertensão arterial e avaliação de fatores associados em crianças e adolescentes de escolas públicas de Salvador, Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Brasil, v.27, n.6, p.1065-1076, 2011.

PRISANT, L.M. Nebivolol: pharmacologic profile of an ultraselective, vasodilatory  $\beta$ 1-bloker. **J Clin Pharmacol**, USA, v.48, n.2, p.225-239, 2008.

RAMAKRISHNA, N.V.S.; VISHWOTTAM, K.N.; KOTESHWARA, M.; MANOJ, S.; SANTOSH, M.; VARMA, D.P. Rapid quantification of nebivolol in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, India, v.39, n.5, p.1006-1013, 2005.

SELVAN, P.S; VEERAN GODWDA, K; MANDAL,U; SAM SOLOMON, W.D; PAL, T.K. Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **J Cromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci**, India, v.858, n.1-2, p.143-150, 2007.


SHARMA, M & HAKIM, A.M. The management of hypertension for primary stroke prevention: a proposed approach. **Int J Stroke**, Canada, v.6, n.2, p.144-149, 2011.

TUCKER, G.T.; LENNARD, M.S. Enantiomer specific pharmacokinetics. **Pharmacol. Ther**, UK, v.45, n.3, p.309-29, 1990.

VAN PEER, A.; SNOECK, E.; WOESTENBORGHES, R.; VAN DE VELDE, V.; MANNENS, G.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Clinical pharmacokinetics on nebivolol. A review. **Drug Invest**, Belgium, v.3(Suppl 1), p.25-30, 1991.



**Anexo 1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.**

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
www.hcrp.fmrp.usp.br		
Ribeirão Preto, 16 de setembro de 2009		
Ofício nº 3091/2009 CEP/MGV		
<b>Prezada Senhora,</b>		
<p>O trabalho intitulado <b>“INFLUÊNCIA DA SÍNDROME NEFRÓTICA PRIMÁRIA NA FARMACODINÂMICA E NA FARMACOCINÉTICA DOS ENANTIÔMEROS DO NEBIVOLOL”</b>, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 295ª Reunião Ordinária realizada em 14/09/2009, e enquadrado na categoria: <b><u>APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</u></b>, de acordo com o Processo HCRP nº 4887/2009.</p>		
<p><i>Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.</i></p>		
<p><u>Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.</u></p>		
Atenciosamente.		
<p style="text-align: center;">   <b>DR. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA</b>          Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em          Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP       </p>		
<p>Ilustríssima Senhora  <b>CAROLINA PINTO VIEIRA</b>  <b>PROFª. DRª. VERA LUCIA LANCHOTE(Orientadora)</b>          Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas – FCFRP-USP</p>		
<p style="text-align: center;">         Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP- Campus Universitário          FWA-00002733, IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4          Fone / Fax: 3603-2228 - E-mail: comite@hcrp.fmrp.usp.br       </p>		

**Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

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

**PESQUISA CIENTÍFICA  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

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

NOME DA PESQUISA: **“Influência da síndrome nefrótica primária na farmacodinâmica e na farmacocinética dos enantiômeros do nebivolol”**

**RESPONSÁVEL CLÍNICO:** Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho (Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nefrologia HC-FMRP-USP) – CREMESP 68.329.

**RESPONSÁVEL PELA APLICAÇÃO DO TCLE:** Carolina Pinto Vieira (aluna de pós-graduação FCFRP-USP)

**TELEFONE PARA CONTATO:** (16) 3602 2543 ou (16) 3602-4699

**OBSERVAÇÕES:** Projeto Integrado Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

*TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*

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

1- “O nosso estudo procura entender se a doença dos rins, chamada de síndrome nefrótica, modifica o efeito de um remédio usado para abaixar a pressão arterial. A síndrome nefrótica é uma doença que afeta os rins e ocasiona inchaço no corpo e presença de espuma na urina. Alguns remédios têm o efeito alterado pela doença

nos rins, podendo aumentar ou mesmo ter o seu efeito diminuído. Para a realização deste estudo, serão necessárias pessoas com e sem problema nos rins (síndrome nefrótica). Assim, todas as pessoas que irão participar desta pesquisa vão ter um exame de saúde feito em primeiro lugar para saber se existe algum problema dos rins. Os remédios que você toma para controlar a pressão serão trocados para um remédio chamado Nebivolol, que também é utilizado para o controle da pressão arterial. Pode acontecer de você sentir câimbras, fraqueza e tonturas. Este estudo terá somente uma etapa, em que você terá que vir até o Hospital (HC) em jejum de 12 horas, e irá receber um comprimido de 5 mg uma única vez de um remédio usado para abaixar a pressão, chamado Nebivolol, que você tomará com um copo de água. Nós iremos coletar amostras de 5 mL de sangue (cerca de uma colher de sopa) da veia do seu braço várias vezes (cerca de 15 vezes). Um tubinho de plástico será colocado dentro da sua veia, assim nós iremos picar você uma única vez. Por se tratar de apenas uma dose nós não esperamos que você apresente nenhum efeito colateral do remédio. Em todo caso, pode acontecer de aparecerem efeitos exagerados do remédio como cansaço, fraqueza ou falta de ar, além de poder cair o valor da sua pressão. Se isso ocorrer, nós iremos tratá-lo aqui mesmo no hospital e iremos interromper a pesquisa. Após o término da fase, você receberá um comprimido chamado metoprolol (100 mg) para avaliar como o seu fígado está funcionando e durante 8 horas após a administração deste remédio será coletada toda sua urina. Assim, se você quiser participar da pesquisa, você terá que vir pelo menos 2 vezes ao Hospital: uma para ser examinado, uma para tomar o remédio. Na vez que você vier tomar o remédio, você terá que ficar internado no Hospital por 48 horas para as coletas de sangue. Além de coletar o seu sangue, nós também vamos medir durante o tempo em que você ficar no Hospital a sua pressão arterial e os seus batimentos cardíacos através de um monitor. Iremos colocar alguns elétrodos na parte externa do peito, durante o período em que você estiver internado e uma bolsa de borracha para medir a sua pressão a cada meia hora. Nós iremos pedir para que você aperte uma mola a cada vez que for coletar sangue para ver o efeito do remédio sobre os batimentos do coração

A sua colaboração será importante para entendermos como ajustar a dose desses medicamentos para o controle de pressão arterial. Isto poderá ajudar na escolha do melhor tratamento e no ajuste da dose dos remédios para pessoas que tem problema nos rins, em especial pacientes com síndrome nefrótica.

2- Você não é obrigado a continuar participando do projeto e pode, a qualquer momento sair do mesmo, sem que isso impeça que você deixe de ser tratado como os demais pacientes do Hospital das Clínicas.



- 3- A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para você. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender, de imediato, minha participação como voluntário.
- 4- Os pesquisadores garantem que responderão a qualquer pergunta ou farão esclarecimentos a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e com o tratamento que você será submetido.
- 5- Os pesquisadores se comprometem a proporcionar a você informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a sua vontade de continuar participando da pesquisa.
- 6- Os pesquisadores se comprometem a manter sigilo da sua participação e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica pertinente.
- 7- Você terá direito a ressarcimento financeiro caso haja gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.
- 8- Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito a indenização.

#### TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1-.....  
identificação

.....  
Assinatura

2-.....  
identificação

.....  
Assinatura

### Anexo 3 – Características dos voluntários investigados

**Tabela i:** Dados individuais da disposição cinética enantiosseletiva do *d*-neбиволол em plasma de voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de neбиволол racêmico.

Voluntários	C <sub>max</sub> (pg/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC (h*pg/mL)	Vd/F (L)	Cl/F (L/h)	α(1/hr)	β(1/hr)	T1/2
1	382	1,4	5746	16193	870	0,63	0,03	22
2	541	0,6	3677	46200	1360	1,69	0,05	15
3	845	1,0	3947	4231	1267	0,69	0,10	7
4	1214	1,0	6565	7715	762	1,52	0,06	11
5	1275	0,9	8311	3353	602	0,64	0,08	9
6	1003	1,0	8985	2980	556	5,13	0,11	6
7	818	0,8	3070	13435	1629	2,34	0,08	9
8	435	1,3	3869	32274	1292	1,17	0,03	25
9	1110	0,6	5519	9439	906	1,79	0,06	11
10	648	0,8	3685	17957	1357	1,32	0,04	16
11	793	1,0	3991	14940	1253	0,63	0,04	17
12	513	1,2	4511	42007	1108	1,72	0,02	32
13	414	1,2	1957	9949	2554	1,70	0,05	12
14	3877	2,5	57452	771	82	0,74	0,05	12
15	1857	1,6	13495	323	370	1,31	0,07	10

**Tabela ii:** Dados individuais da disposição cinética enantiosseletiva do *l*-nebivolol em plasma de voluntários sadios tratados com dose única oral de 10 mg de nebivolol racêmico.

Voluntários	C <sub>max</sub> (pg/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC (h*pg/mL)	Vd/F (L)	Cl/F (L/h)	$\alpha$ (1/hr)	$\beta$ (1/hr)	T1/2
1	584	1,3	6132	10306	815	0,34	0,03	23
2	835	0,5	3763	23846	1329	4,42	0,06	12
3	2384	0,9	9398	5717	532	1,00	0,05	15
4	2029	0,9	12353	3912	405	0,98	0,06	12
5	1763	0,6	11897	5774	420	1,21	0,05	15
6	2146	0,8	12672	1837	395	0,85	0,08	9
7	1852	0,5	6456	5721	775	0,83	0,06	13
8	1978	0,6	8040	11165	622	1,74	0,04	17
9	1166	1,1	6075	11585	823	1,30	0,05	15
10	1456	1,2	5380	14207	929	0,92	0,04	19
11	1469	1,1	8097	8960	618	0,73	0,03	20
12	1464	0,3	6119	9524	817	0,82	0,05	15
13	609	1,2	2622	8803	1907	1,30	0,11	7
14	3719	2,5	61832	4874	81	0,62	0,04	15
15	2214	1,6	14315	4411	349	1,42	0,05	14

**Anexo 4 -** Parâmetros bioquímicos usados para a avaliação da normalidade funcional dos sistemas/órgãos hematológico, renal, hepático e endócrino

**Tabela i:** Parâmetros bioquímicos dos voluntários investigados

Parâmetros Valores de Referência	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>Na+</b> 135-145 mmol/L	138	139	140	136	138	142	140	141	140	140	135	134	140	139	143
<b>Creatinina</b> 0,7-1,5 mg/dL	0,9	0,9	0,82	1,1	0,7	0,8	1	1	1,1	0,83	1,1	1,1	1,2	0,9	0,7
<b>AST</b> Até 38 U/L	15	14	13	22	13	20	20	20	22	21	16	18	41	15	19
<b>ALT</b> Até 31 U/L	21	22	8	13	16	17	14	15	25	15	13	32	42	40	33
<b>Bilirrubina total</b> 0,2-1,2 mg/dL	0,68	0,26	0,38	0,91	0,39	1,56	0,59	0,56	0,69	0,51	0,61	0,67	0,76	0,37	1,16
<b>Bilirrubina direta</b> 0,0-0,3 mg/dL	0,24	0,11	0,15	0,25	0,14	0,48	0,20	0,22	0,26	0,16	0,23	0,21	0,22	0,13	0,42
<b>Bilirrubina indireta</b> 0,3-1,9 mg/dL	0,44	0,15	0,24	0,65	0,25	1,08	0,40	0,39	0,43	0,35	0,38	0,47	0,54	0,24	0,74
<b>Glicemia</b> 70-110 mg/dL	73	85	92	77	79	76	84	78	140	76	75	81	78	86	85
<b>K+</b> 3,5-5,0 mmol/L	4	4,5	4	4,4	4,2	4,3	4,2	4	4,1	4,3	4,2	4	4,3	4,6	4,2
<b>Gama GT</b> homem:10 A 50 U/L mulher:07 A 32 U/L	22	17	15	61	15	17	23	22	23	12	15	29	25	15	19
<b>Colesterol HDL</b> 40 a 80 mg/dl	40	42	36	35	39	45	38	36	36	39	38	36	38	48	27
<b>Colesterol LDL</b> 50 a 140 mg/dl	99	119	124	112	108	85	83	83	88	98	58	141	84	87	46
<b>Triglicérides</b> < 150 mg/dl	38	154	73	154	78	57	69	75	76	97	73	77	72	127	36
<b>Albumina</b> 3,5-4,8 g/dL	4,6	4,4	4,3	4	4,1	4,2	4,2	4	4	4,5	4,1	4,3	4,4	4,6	9,7