

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JULIANA SAVIOLI SIMÕES

Influência do Diabetes Mellitus no metabolismo de fármacos marcadores de atividade dos CYP 2D6 e 3A4 em ratos.

ALFENAS-MG

2014

JULIANA SAVIOLI SIMÕES

# **Influência do Diabetes Mellitus no metabolismo de fármacos marcadores de atividade dos CYP 2D6 e 3A4 em ratos**

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área concentração: Ciências Farmacêuticas  
Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Alfenas/MG

2014

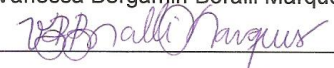
JULIANA SAVIOLI SIMÕES

**Influência do Diabetes Mellitus no metabolismo de fármacos  
marcadores de atividade dos CYP2D6 e 3A4 em ratos**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área concentração: Ciências Farmacêuticas  
Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

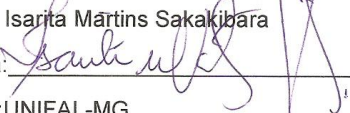
Aprovada em 28/04/2014

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Assinatura: 

Instituição: UNIFAL-MG

Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara

Assinatura: 

Instituição: UNIFAL-MG

Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinin

Assinatura: 

Instituição: UNESP

Alfenas/MG

2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques por me orientar sem me conhecer, por acreditar que seria capaz, sua orientação, conhecimento compartilhado, conselhos e disponibilidade em todos os momentos.

A minha mãe e meu irmão, pelo amor incondicional e apoio para realização de mais este sonho.

A todos do LATF- Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos- pela convivência tornando o laboratório um local sempre agradável e acolhedor, amenizando as angustias vividas durante essa jornada.

À Patrícia Penido Maia, pela sua amizade, paciência e suporte para realização deste trabalho.

À amiga Lígia Godoy Gruli, minha primeira escrivinha, pelo suporte para realização deste trabalho, por todos os momentos de apoio, amizade, pelas horas no biotério e laboratório, tornando as madrugadas e os fins de semanas divertidos e prazerosos.

À amiga Taila Kawano, pelos conhecimentos compartilhados e ajuda na etapa final deste trabalho.

Às minhas segundas escrivinhas Camila de Oliveira e Lídia Wiazowski, pelo suporte para realização deste trabalho.

Aos amigos que me acompanharam esses dois anos principalmente, Lailah Abrão, Aline Swerts, Mônica Esselin, Leonardo Pacheco, Olímpia Martins e André Luiz Viana, por sempre garantirem momentos de amizade, alegria e apoio.

À Profa. Isarita Martins, pela supervisão no estágio docente e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Eduardo Costa, pelo conhecimento compartilhado e pela disposição em sempre ajudar com os equipamentos.

Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL, especialmente ao João Vítório pelas ajudas.

À UNIFAL-MG, à FAPEMIG e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

## RESUMO

O citocromo P450 (CYP450) e suas isoformas podem ser reguladas por compostos exógenos, endógenos e patologias. O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da incapacidade da insulina em exercer adequadamente sua ação, sendo capaz de alterar a atividade do CYP450. Este estudo avalia a influência do DM na atividade das isoformas CYP2D6 e CYP3A4 utilizando como marcadores de atividade o metoprolol (MET) e o midazolam (MDZ) respectivamente. Ratos machos Wistar, 200-250 g, foram tratados com dose única, por via oral 20 mg/Kg para MET e 15 mg/Kg para MDZ. O DM foi induzido por estreptozotocina (50 mg/Kg) por via intravenosa. Midazolam, metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol foram analisados em plasma por cromatografia líquida de ultraperformance (coluna XR-ODS 100 mm x 3,0 mm) acoplada a espectrômetro de massas. O preparo das amostras foi realizado por extração líquido-líquido. A análise farmacocinética do MDZ em ratos mostrou redução significativa (54,01 vs 12,24 L/h/kg) no *clearance* dos animais diabéticos em relação ao controle e aumento significativo (402,66 vs 1742,6 h.ng/mL) do  $AUC^{0-\infty}$  no grupo diabético quando comparado com o controle. O DM modificou o  $AUC^{0-\infty}$  do MET no grupo diabético em relação ao controle (998,09 vs 348,45 h.ng/mL) acompanhado de redução significativa do *clearance* no grupo diabético (46,85 vs 17,80 L/h/kg). Desde que não foi observada qualquer alteração na farmacocinética do alfa-hidroxi metoprolol, o aumento do  $AUC^{0-\infty}$  do MET pode ser devido à inibição de outra via de metabolização pelo DM, como comprovado pela alteração na via do CYP3A. A análise dos dados sugere que o DM inibe a atividade do CYP3A4 e não exerce influência sobre a atividade do CYP2D6.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. midazolam. metoprolol. alfa-hidroxi metoprolol. UPLC-MS/MS. CYP2D6. CYP3A4. estreptozotocina.

## ABSTRACT

Cytochrome P450 (CYP450) and its isoforms can be regulated by exogenous and endogenous compounds and also diseases. Diabetes Mellitus (DM) is a multiple etiology syndrome resulting from a lack or inability of insulin to properly exercise its action, that can modify the CYP450 activity. This research evaluates the influence of DM on CYP2D6 and CYP3A4 isoforms activity employing metoprolol (MET) and midazolam (MDZ) as probe drugs. Male Wistar rats 200-250g, were treated with single oral dose of 20mg/kg for MET and 15 mg/kg for MDZ. Diabetes mellitus was induced by streptozotocin (50mg/kg) intravenously administered. Midazolam, metoprolol and alpha-hydroxymetoprolol were analyzed in plasma by ultraperformance liquid chromatography (column XR-ODS) coupled to a mass spectrometer. The sample preparation was performed using liquid-liquid extraction. Pharmacokinetics of MDZ in rats showed a significant decrease (54,01 vs 12,24 L/h/kg) of total clearance in the diabetic animals compared to control group and a significant increase (402.66 vs 1742.6 h.ng/mL)  $AUC^{0-\infty}$  in the diabetic group compared with the control. The DM altered the  $AUC^{0-\infty}$  of MET in the diabetic group compared to control (998.09 vs 348.45 h.ng/mL) followed by a significant decrease in clearance in the diabetic group (46.85 vs 17.80 L/h/kg). Since no changes in alpha-hydroxymetoprolol pharmacokinetics was observed, the increase in MET  $AUC^{0-\infty}$  can be explained by DM inhibition of other MET metabolism pathways. Data analysis suggests that DM inhibits CYP3A4 activity and had no effect on CYP2D6 activity.

Keywords: Diabetes mellitus. midazolam. metoprolol. alpha-hydroxymetoprolol. UPLC-MS/MS. CYP2D6. CYP3A4. streptozotocin.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Metoprolol suas principais vias de metabolização e produtos gerados.....	19
Figura 2 - Via de formação do metabólito 1'- hidroximidazolam.....	20
Figura 3 - Análise cromatográfica do metoprolol e metabólito: alfa-hidroximetoprolol (A); metoprolol (B) e PI (C).....	39
Figura 4 - Curva analítica do metoprolol em plasma de rato.....	40
Figura 5 - Curva analítica do alfa-hidroximetoprolol em plasma de rato.....	40
Figura 6 - Análise cromatográfica da amostra branco após duas injeções do LSQ, alfa-hidroximetoprolol (A), metoprolol (B), PI (C).....	42
Figura 7 - Análise cromatográfica do midazolam: PI (A) e Midazolam (B).....	44
Figura 8 - Curva analítica do midazolam em plasma de rato.....	45
Figura 9 - Análise cromatográfica da amostra branco após duas injeções do LSQ.....;	46
Figura 10 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo para grupo metoprolol controle (preto), grupo metoprolol diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).....	49
Figura 11 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo alfa-hidroximetoprolol grupo controle (preto) e grupo diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).....	50
Figura 12 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo Midazolam grupo controle (preto), grupo diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).....	51



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Equipamentos e materiais utilizados para a validação.....	26
TABELA 2 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em plasma por UPLC-MS/MS.....	30
TABELA 3 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de midazolam em plasma por UPLC-MS/MS.....	31
TABELA 4 - Coeficiente de variação do FMN referente ao método analítico para quantificação de metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol em amostra de plasma.....	41
TABELA 5 - Precisão e exatidão intracorrída e intercorrídas referente ao método analítico para quantificação de metoprolol em plasma.....	42
TABELA 6 - Precisão e exatidão intracorrída e intercorrídas referente ao método analítico para quantificação de alfa-hidroxi metoprolol em plasma.....	43
TABELA 7 - Estudo da estabilidade de curta duração, ciclos de congelamento, Pós-processamento e longa duração do método de análise do metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol em plasma de rato.....	43
TABELA 8 - Estudo estabilidade metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol e PI em solução.....	44
TABELA 9 - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de midazolam em plasma.....	46
TABELA 10 - Precisão e exatidão intracorrída e intercorrída referente ao método analítico para quantificação de midazolam em plasma.....	47
TABELA 11 - Estudo da estabilidade de curta duração, ciclos de congelamento, pós-processamento e longa duração do método de análise do midazolam em plasma de rato.....	47
TABELA 12 - Estudo estabilidade do midazolam e PI em solução.....	48

TABELA 13 - Parâmetros farmacocinéticos (AUC e $Cl/f$ ) para metoprolol administrado por VO em ratos (dose= 15 mg/Kg) Média, Intervalo de confiança (IC), n=6 para cada tempo.....	49
TABELA 14 - Parâmetro farmacocinético (AUC) para alfa-hidroximetoprolol . administrado por VO em ratos (dose= 15,9). Média, IC, n=6 para cada tempo.....	49
TABELA 15 - Parâmetros farmacocinéticos (AUC e $Cl_T/f$ ) para Midazolam administrado por VO em ratos (dose= 20 mg/Kg). Média, Intervalo de confiança (IC), n=6 para cada tempo.....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>Cl<sub>T/f</sub></b> -	Clearance total aparente
<b>C<sub>max</sub></b> -	Concentração plasmática máxima
<b>CQ</b> -	Controle de Qualidade
<b>CQA</b> -	Controle Alto de Qualidade
<b>CQB</b> -	Controle Baixo de Qualidade
<b>CQM</b> -	Controle Médio de Qualidade
<b>CV</b> -	Coeficiente de Variação
<b>CYP</b> -	Citocromo
<b>CYP450</b> -	Citocromo P450
<b>DCV</b> -	Doença cardiovascular
<b>DM</b> -	Diabetes Mellitus
<b>DM1</b> -	Diabetes Mellitus tipo 1
<b>DM2</b> -	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>DMR</b> -	Razão metabólica da debrisoquina
<b>DRR</b> -	Razão de recuperação da debrisoquina
<b>EPR</b> -	Erro Padrão Relativo
<b>FMN</b> -	Fator de matriz normalizado
<b>HPLC</b> -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>I V</b> -	Intravenosa
<b>IDDM</b> -	Diabete Mellitus insulino dependente
<b>K<sub>a</sub></b> -	Constante de velocidade de absorção
<b>LIQ</b> -	Limite Inferior de Quantificação
<b>LSQ</b> -	Limite Superior de Quantificação

<b>MDZ -</b>	Midazolam
<b>MET -</b>	Metoprolol
<b>NIDDM -</b>	Diabetes Mellitus não insulino dependente
<b>OMS -</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PI -</b>	Padrão Interno
<b>PM -</b>	Metabolizador lento
<b>SBD -</b>	Sociedade Brasileira de Diabetes
<b>STZ -</b>	Estreptozotocina
<b>Tmax -</b>	Tempo para atingir concentração máxima
<b>t<sup>1</sup>/<sub>2</sub>β -</b>	Meia vida de eliminação
<b>TFA -</b>	Ácido trifluoroacético
<b>UM -</b>	Metabolizador ultra-rápido
<b>UPLC-MS/MS -</b>	Cromatografia líquida de alta performance acoplado a espectrômetro de massa
<b>UV -</b>	Ultravioleta
<b>V.O -</b>	Via oral
<b>β -</b>	Beta/ constante de velocidade de eliminação

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
3	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	25
3.1	FÁRMACOS.....	25
3.2	SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA.....	25
3.3	SOLVENTES E REAGENTES.....	25
3.4	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	26
3.5	ESTUDO EXPERIMENTAL.....	26
3.5.1	<b>Protocolo de indução do DM</b> .....	27
3.5.2	<b>Grupos experimentais</b> .....	27
3.5.2.1	Grupos controle.....	27
3.6	ANÁLISE DO METOPROLOL E ALFA-HIDROXIMETOPROLOL EM PLASMA.....	28
3.6.1	<b>Preparo de amostra e análise cromatográfica do metoprolol e seu metabólito</b> .....	29
3.7	ANÁLISE DO MIDAZOLAM EM PLASMA.....	30
3.7.1	<b>Preparo de amostra e análise cromatográfica do midazolam</b> .....	31
3.8	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	32
3.8.1	<b>Curva de calibração</b> .....	32
3.8.2	<b>Precisão/exatidão</b> .....	32
3.8.3	<b>Efeito residual</b> .....	33
3.8.4	<b>Efeito matriz</b> .....	33
3.8.5	<b>Estabilidade do analito em matriz biológica</b> .....	34
3.8.5.1	Estabilidade após ciclos de congelamento.....	34
3.8.5.2	Estabilidade de curta duração.....	34
3.8.5.3	Estabilidade de longa duração.....	35
3.8.5.4	Estabilidade pós-processamento.....	35
3.8.5.5	Estabilidade do analito e PI em solução.....	35
3.8.6	<b>Recuperação</b> .....	36
3.9	ANÁLISE FARMACOCINÉTICA.....	36
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METOPROLOL E ALFA-HIDROXIMETOPROLOL EM PLASMA DE RATO.....	38
4.1.1	<b>Linearidade.....</b>	39
4.1.2	<b>Efeito matriz.....</b>	41
4.1.3	<b>Efeito residual.....</b>	41
4.1.4	<b>Precisão e exatidão.....</b>	42
4.1.5	<b>Estabilidade.....</b>	43
4.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MIDAZOLAM EM PLASMA DE RATO.....	44
4.2.1	<b>Linearidade.....</b>	45
4.2.2	<b>Efeito matriz.....</b>	46
4.2.3	<b>Efeito residual.....</b>	46
4.2.4	<b>Precisão Exatidão.....</b>	47
4.2.5	<b>Estabilidade.....</b>	47
4.2.6	<b>Recuperação.....</b>	48
4.3	ESTUDO EXPERIMENTAL.....	48
4.3.1	<b>Farmacocinética do metoprolol e metabólito em ratos.....</b>	48
4.3.2	<b>Farmacocinética do midazolam em ratos.....</b>	50
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	52
6	<b>CONCLUSÃO.....</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

O controle da variabilidade interindividual na resposta aos fármacos disponíveis na clínica representa um dos maiores desafios da Farmacologia Clínica. Devido à variação interindividual da biotransformação de um fármaco, pacientes que receberam a mesma dose pode apresentar diferentes concentrações plasmáticas desse, esse fenômeno ocorre devido à variação na expressão do CYP450 (LIN et al., 2001). Os estudos de metabolismo de fármacos têm permitido a identificação das principais enzimas de fase I e II responsáveis pelas conversões metabólicas. Porém, a grande variabilidade individual no metabolismo destes fármacos representa um obstáculo importante porque pode levar a resultados indesejáveis e difíceis de prever, como a variação no intervalo terapêutico e a manifestação de efeitos tóxicos em sub-populações específicas que levariam a diferenças na resposta (MATERSON, 2007).

Os fármacos administrados para controle de uma patologia são metabolizados pelo organismo por um conjunto de enzimas e proteínas. O CYP450 é uma superfamília de hemoproteínas responsável por metabolizar componentes endógenos e exógenos (DOSTALEK et al., 2011). Dentro das famílias do CYP 450, pode-se destacar a 1, 2 e 3, pois são responsáveis pela biotransformação de aproximadamente 96% dos xenobióticos (GUENGERICH, 1999). Esse conjunto de enzimas pode ser regulado pela ação de alguns fármacos, compostos exógenos, endógenos e patologias (SHIMOJO et al., 1993).

O Diabetes Mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente sua ação. Clinicamente se manifesta como hiperglicemia crônica, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. As consequências do DM em longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia com a possibilidade de cegueira, a neuropatia com risco de úlceras nos pés, a amputações e a manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Pacientes portadores de DM tipo 2 (DM2) apresentam maior risco de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença

arterial periférica e doença vascular cerebral (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES,2009).

Os portadores de diabetes representam a sexta causa mais importante de internação hospitalar, sendo cerca de 30% dos internados em unidades coronarianas intensivas com dor precordial e 26% dos ingressantes em programas de diálise e dentre das possíveis complicações ocasionadas pelas comorbidades estão à amputação de membros inferiores e a cegueira adquirida (SBD, 2009).

Conforme a Organização Mundial de Saúde (2012) estima que cerca de 3,4 milhões de pessoas morreram em consequência do alto nível de açúcar no sangue, e projeta que a morte causada pelo diabetes irá dobrar até 2030. Mesmo sendo uma patologia conhecida há muitos anos sua incidência na população é alta e crescente. De acordo com Federação Internacional de Diabetes (2013) os índices são alarmantes, o número mundial de casos de diabetes registrado foi de 371 milhões de portadores entre 20 e 79 anos de idade. Dentre os países com maior índice de diabéticos por território, a China ocupa o primeiro lugar com 92,3 milhões de casos, seguido da Índia (63 milhões), EUA (26,1 milhões) e em quarto lugar o Brasil com 13,4 milhões de portadores. No nosso território, de acordo com pesquisa recente, o número de novos casos em homens é superior ao das mulheres (BRASIL, 2013).

A doença é classificada em três tipos DM tipo 1 (DM1), DM2 e DM gestacional. O DM1, anteriormente chamada de DM insulino dependente (IDDM), é aquela em que o paciente não produz mais insulina, sendo dependente da aplicação da mesma para o controle da glicemia. O DM2, anteriormente conhecido como DM não insulino dependente (NIDDM), é responsável por 90% dos casos diagnosticados (BRASIL, 2013) sendo sua incidência de 5% da população mundial entre 20 e 79 anos (OMS, 2012). Por apresentar sintomatologia leve, essa se tornou uma das principais causas de morte prematura, principalmente através do risco aumentado de doença cardiovascular (DCV), que é responsável por até 80% de mortes (OMS, 2012).

Na maioria dos casos de DM2 a ação da insulina é deficiente e seus níveis podem estar tanto dentro do intervalo de referência, acima ou abaixo. A idade usual de ocorrência deste tipo é após os 40 anos de idade, porém pessoas mais jovens também podem apresentar. Por fim, o DM gestacional no qual a alteração no nível de glicose ocorre pela primeira vez durante a gravidez sendo semelhante a DM2 e normalmente desaparecendo após resolução da gravidez.



O DM pode alterar a disposição cinética e o metabolismo de fármacos dependendo da afinidade pelas proteínas plasmáticas, do tipo de diabetes e do tempo de diagnóstico da doença. O DM pode alterar a absorção gastrintestinal, a distribuição, o metabolismo e a excreção renal dos fármacos em uso na clínica. O tempo de trânsito intestinal pode estar alterado em 20 – 30% dos pacientes diabéticos. O DM também pode alterar a ligação às proteínas plasmáticas alterando as fases de distribuição e eliminação. A elevada concentração de ácidos graxos livres e proteínas glicosiladas podem alterar a extensão da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas em pacientes diabéticos (PRESTON et al., 2001). Dependendo da duração do DM ou do estágio da nefropatia diabética, a velocidade de filtração glomerular pode estar aumentada, normal ou diminuída. Além disso, anormalidades na secreção renal tanto em pacientes com DM1 ou DM2, podem influenciar o *clearance* renal de uma variedade de fármacos (PRESTON; EPSTEIN, 1999).

Um problema para se estabelecer a relação entre DM e expressão/atividade do CYP450 são as informações conflitantes na literatura, devido a fatores associados como idade, gênero, duração da doença e grau de controle do diabetes e o polimorfismo das isoformas do CYP450 (WANG et al., 2007). Estudos clínicos e experimentais vêm demonstrando que o DM pode alterar a atividade de diversas enzimas, incluindo enzimas do CYP, provocando modificações diferenciadas na expressão de suas isoformas (PAUL; ALBERTI; JONATHAN, 2001). O DM, experimentalmente induzido em ratos, tende a suprimir a expressão do CYP1A2, CYP2C11, CYP2C13 e CYP3A2 e a induzir a expressão do CYP2A1, CYP2B1, CYP2C12, CYP4A1 e CYP2E1 (SCHENKMAN, 1991; IBER et al., 2001).

Matzke et al. (2000) reportam que o metabolismo da antipirina é induzido em pacientes portadores de DM1, sugerindo aumento na atividade do CYP1A2. Hannon-Fletcher et al. (2001) reportam que a expressão do CYP2E1 é elevada em até 3,1 vezes em pacientes portadores de DM1.

Marques et al. (2002) investigaram a influência do DM2 nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da nisoldipina em pacientes hipertensos portadores ou não de DM. Os resultados mostraram que o DM2 reduziu o *clearance* de ambos os enantiômeros da nisoldipina, provavelmente devido a uma menor atividade do CYP3A4.

Em estudo experimental com fármaco, no qual o DM foi induzido por estreptozotocina (STZ) em ratos, o *clearance* do enantiômero (+)-3R,5S-fluvastatina foi significativamente reduzido (ROCHA; COELHO; LANCHOTE, 2002). Poggi et al. (2004) também relatam aumento no metabolismo do fenoprofeno em ratos com diabetes experimental induzido por STZ, os autores sugerem um aumento unidirecional na velocidade de inversão quiral do enantiômero R ao eutômero S. Desta maneira, percebe-se que a patologia pode ter diferentes influências em isoformas variadas.

O conhecimento das bases moleculares para a indução ou inibição do CYP tem mostrado grande progresso. Uma avaliação dos mecanismos de eliminação metabólica de 315 fármacos diferentes revelou que 56% deles são eliminados primariamente pela ação das isoformas do CYP. Dentre elas o CYP3A4 é o sistema mais importante, sendo responsável pela eliminação de 50% dos fármacos existentes no mercado atualmente (WILKINSON, 1996), seguindo-se o CYP2D6 com 20% e o CYP2C9/19 com 15%, além da participação do CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2 e outros não identificados. Todas essas isoformas podem ser induzidas ou inibidas por diferentes substâncias químicas (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999).

Alguns fármacos possuem uma via de metabolização completamente dependente de uma única isoforma do CYP, por isso eles podem ser utilizados como fármacos marcadores de atividade (*probe drugs*). O metoprolol (MET), um  $\beta$ -adrenérgico que possui amplo uso clínico, e seu metabólito ativo o alfa-hidroximetoprolol podem ser usados para quantificar a expressão da isoforma do CYP2D6, uma vez que é metabolizado exclusivamente por esta forma (MURTHY et al.1990), sendo que metabolizadores lentos tem uma dramática diferença na farmacocinética do metoprolol, quando comparados com metabolizadores extensivos (LANCHOTE et al., 2000). As três vias oxidativas de metabolização podem ser observadas na Figura 1.

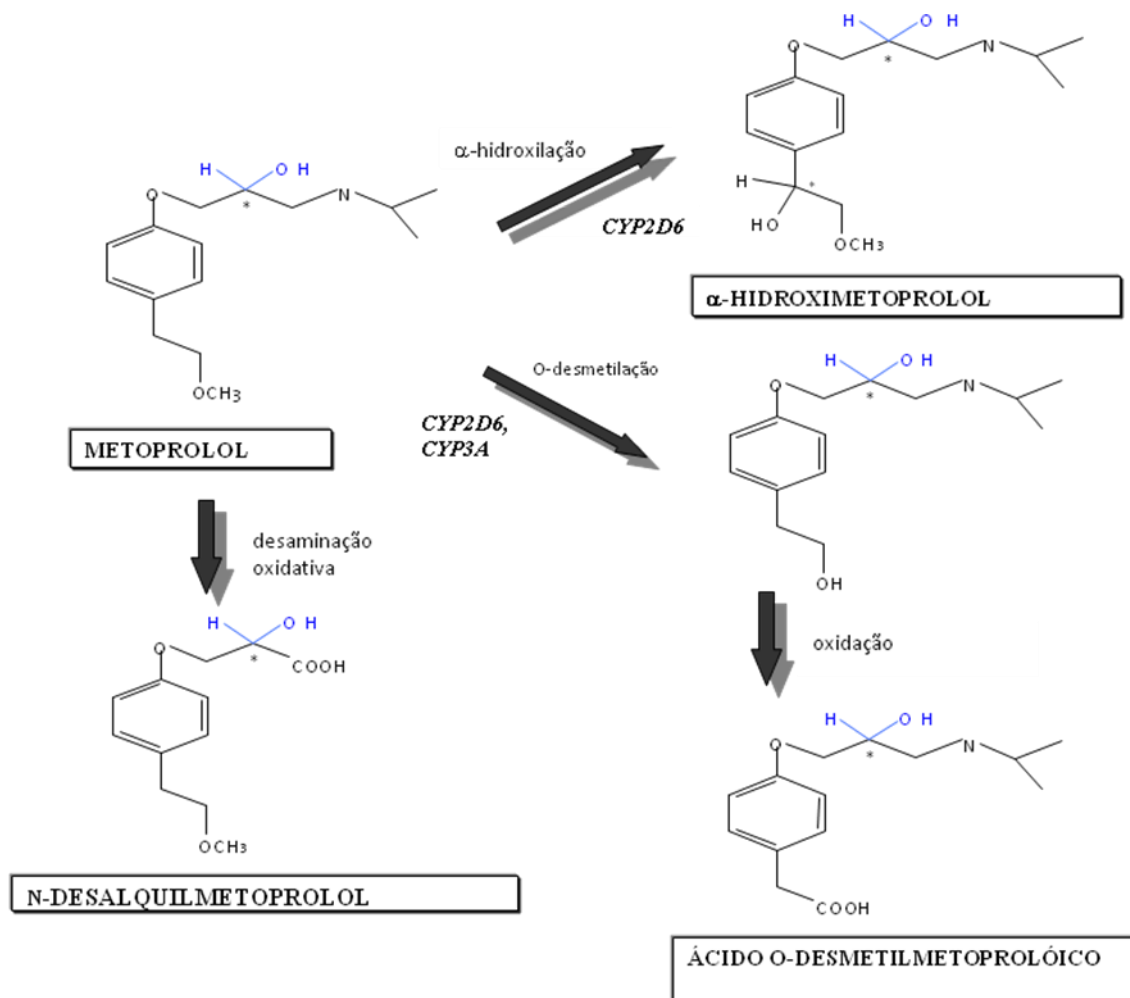


FIGURA 1 - Metoprolol suas principais vias de metabolização e produtos gerados  
 Fonte: BORALLI et al.,2005.

Devido às diferenças genéticas, aproximadamente 7% da população caucasiana e 1% da população chinesa não expressam ou expressam baixa atividade do CYP2D6 (BERTILSSON, 1985) (metabolizador lento, PM) e, conseqüentemente manifestam altas concentrações plasmáticas do metoprolol nas doses terapêuticas, enquanto, no outro extremo, 30% da população norte africana (AKLILLU et al., 1996) e 1% dos caucasianos da Suécia (JOHANSSON et al., 1993; DAHL et al., 1995) apresentam um ou mais gene(s) extra-ativo(s) do CYP2D6 levando a metabolização ultra-rápida do MET e outros substratos com metabolismo dependente desta enzima (metabolizador ultra-rápido, UM).

A debrisoquina é empregada como fármaco marcador da atividade do CYP2D6 *in vivo*, que pode ser estimada pela razão de recuperação da debrisoquina (DRR=4-hydroxidebrisoquina/debrisoquina+4-hydroxidebrisoquina) ou pela razão metabólica (DMR=debrisoquina/4-hydroxidebrisoquina) na urina coletada 6-8 h após

a administração de uma única dose via oral (V.O) de debrisoquina (TUCKER et al., 1977). A razão metabólica varia na população de  $\cong 0,01$  a  $>100$ , sendo que indivíduos que expressam  $DMR < 12,6$  são fenotipados como metabolizadores rápidos e indivíduos que expressam  $DMR < 0,2$  são fenotipados como metabolizadores ultra-rápidos (TUCKER et al., 1977). O fenótipo de metabolizador rápido da debrisoquina também pode ser expresso pela razão de recuperação (DRR) maior que 0,12 (KAISARY et al., 1987).

Foi encontrada forte correlação entre a  $\alpha$ -hidroxilação do MET e a 4-hidroxilação da debrisoquina (CERQUEIRA et al., 2003) na população caucasiana hipertensa na faixa etária de 22 a 77 anos de idade, tornando assim possível a utilização do MET também como marcador da atividade do CYP2D6 (GOURTY et al., 1985). Desta maneira, o MET pode ser utilizado para o estudo do polimorfismo oxidativo do CYP2D6 devido a sua correlação com a debrisoquina, por ser comercializado e prescrito na prática clínica e ser de baixa toxicidade (SOHN et al., 1992).

O midazolam (MDZ) é um benzodiazepínico utilizado como pré-anestésico e sedativo (VERPLAETSE; CUYPERS; TYTGAT, 2012), sendo fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP3A, sua conversão ao metabolito 1'-hidroximidazolam (Figura 2) é exclusivamente realizada pelo CYP3A (JAN et al., 2007).

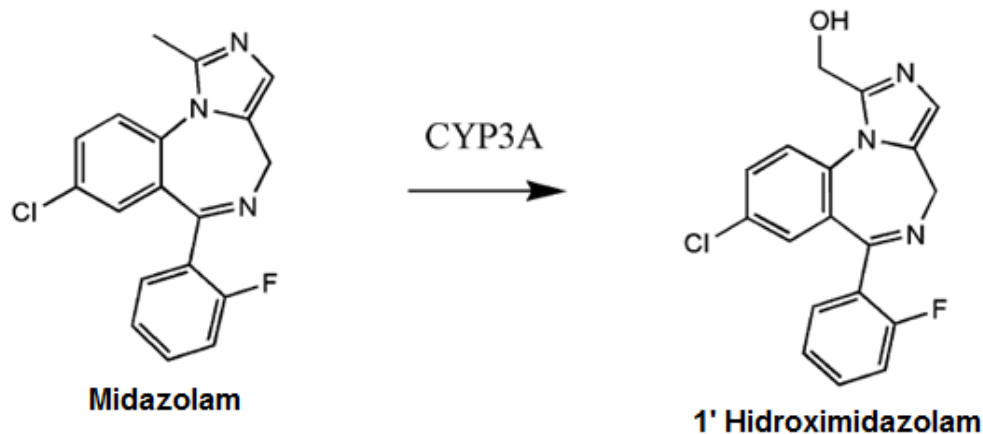


FIGURA 2 - Via de formação do metabolito 1'-hidroximidazolam.  
Fonte: JAN et al., 2007

Após a administração intravenosa (IV) do MDZ, há predominância do metabolismo hepático com formação principalmente do metabolito 1'-hidroximidazolam e recuperação urinária de aproximadamente 70% da dose como

conjugado glicuronídeo do metabólito hidroxilado. Considerando que uma quantidade significativa do CYP3A é encontrada nos enterócitos do intestino delgado e nos hepatócitos, na administração V.O, o MDZ é hidroxilado pelo CYP3A hepático e intestinal. Thummel et al. (1994) relatam que o *clearance* total do MDZ *in vivo* correlaciona-se com o conteúdo hepático *in vitro* do CYP3A. O *clearance* total do midazolam reflete a atividade somente do CYP3A hepático (IV) ou do CYP3A hepático e intestinal (administração V.O) (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000). O *clearance* oral do MDZ, determinado em 148 voluntários, variou entre 10 e 40 mL/min/kg em 84% dos pacientes investigados, no entanto a variabilidade total foi da ordem de 48 vezes (LAMBA et al., 2002). A razão de concentrações plasmáticas 1'-hidroximidazolam/MDZ, determinada 30 min após a administração IV de MDZ, apresenta boa correlação ( $r=0,87$ ,  $p<0,001$ ) com o conteúdo do CYP3A4 hepático em pacientes doadores de fígado (LEE; BERTINO; NAFZIGER, 2006)

No entanto, Lee; Bertino; Nafziger (2006) relatam que na administração V.O de MDZ, a razão de concentrações plasmáticas 1'-hidroximidazolam/MDZ, determinada 30 min, 2 ou 6 h após a administração de MDZ, não reflete de maneira exata a atividade do CYP3A. Ressalta-se ainda, que com base nos dados reportados por Eap et al. (2004), os métodos de genotipagem do CYP3A4 e CYP3A5, não refletem com exatidão suficiente a variabilidade interindividual da atividade do CYP3A.

Para mensurar a atividade das enzimas do CYP450 em plasma, se faz necessário o estudo farmacocinético dos fármacos marcadores. O MET e seu metabólito podem ser quantificados em plasma por meio de cromatografia e posterior estabelecimento da razão metabólica. O *clearance* do MDZ pode ser calculado após quantificação das amostras e modelagem farmacocinética, que poderá ser utilizado para avaliação da atividade.

A quantificação de MET em plasma utilizando diferentes técnicas de extração e quantificação já foi bastante descrita na literatura (ERIKO et al.1994; LANCHOTE et al. 2000; BORALLI et al. 2005; ANGELA et al 2008; YANFENG et al. 2008; NITIN; ROBERT; RICHARD, 2006; FENG et al. 2010; VICTORIA et al.2012; UTPAL et al. 2013). Entretanto, os métodos desenvolvidos previamente apresentam desvantagens como: tempo longo de análise cromatográfica; processo de extração com muitas etapas; grande volume de solvente. A detecção do metoprolol é realizada, na maioria dos trabalhos, empregando cromatografia líquida acoplada à

fluorescência (KOMURA; IWAKI, 2004; BORALLI et al., 2009;).

Os métodos desenvolvidos presentes na literatura para a análise de midazolam empregam HPLC acoplada a detector UV (LEHMANN; BOULIEU, 1995; JAN et al., 2007; CHOVAN; RING; BALDINO, 2007; QUINNEY et al., 2007; LUIGI et al. 2008; TAKUSHI et al., 2008). Essa metodologia possui limitada detectabilidade para baixas concentrações, uma vez que a matriz biológica pode possuir componentes endógenos que interfiram na quantificação do analito de interesse, só sendo possível se associado a preparo de amostra extremamente complexo e utilizando alto volume de solvente.

Para avaliação experimental da influência do DM na farmacocinética e metabolismo de fármacos marcadores, pode-se induzir DM de diferentes maneiras; entre elas estão à indução por agentes químicos como o antibiótico STZ; por meio de agentes hormonais e pelo uso de ratos capazes de desenvolver o diabetes de modo espontâneo. A indução definitiva ocorre com utilização do antibiótico STZ, devido à ação citotóxica nas células beta do pâncreas, especialmente em ratos; outros agentes podem induzir condições tais que o DM seja revertido naturalmente (MASUTANI et al., 1998).

Os sintomas do diabetes induzido por STZ aparecem entre 24 a 72 horas, permitindo sua utilização em ensaios experimentais (SURESH et al., 2012).

O DM é uma patologia mundialmente distribuída, podendo levar ao desenvolvimento de outras doenças o que aumenta o número de internações, aposentadoria por invalidez e até morte do paciente (BRASIL, 2012). Cabe ressaltar que para se atingir as metas de redução da pressão arterial estipuladas para pacientes diabéticos, ou seja, valores menores que 130 x 80 mmHg, se faz necessário o uso de 3 classes de hipotensores em cerca de 75% dos pacientes (SAD, 2012). A maioria dos beta-bloqueadores é metabolizado via CYP2D6 e 50% dos medicamentos via CYP3A4 (RENDIC, 2002). Não existem até o presente momento na literatura estudos da influência do diabetes experimental sob as isoformas 2D6 e 3A4, utilizando *probe drugs*. O presente trabalho tem como objetivo proporcionar o entendimento de como o DM atua no CYP450 estas informações poderão auxiliar o na escolha de medicamentos para comorbidades associadas nestes pacientes, uma vez que uma resposta diferente a um fármaco marcador de uma determinada enzima pode significar a alteração na resposta farmacocinética a

toda uma classe terapêutica, explicando o porquê de certos fármacos causarem respostas inesperadas em pacientes com DM.

## 2 OBJETIVOS

- **Gerais:**

- Avaliar a influência do DM sobre a atividade de CYP2D6 e CYP3A4 em ratos.

- **Específicos:**

- Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para a determinação do midazolam, metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em amostras de plasma de ratos por cromatografia líquida de *ultraperformance* acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS);

- Avaliar e comparar parâmetros farmacocinéticos dos fármacos marcadores entre os grupos de animais.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento da metodologia são apresentados nos itens abaixo.

#### 3.1 FÁRMACOS

Para a administração por V.O dos fármacos marcadores utilizou-se matéria prima, livre de excipientes, adquiridos em farmácia de manipulação. A estreptozotocina foi adquirida da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha).

#### 3.2 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA

As análises foram realizadas com padrões de metoprolol, propranolol, alfa-hidroxi metoprolol, omeprazol, todos da Sigma-Aldrich® e midazolam (Roche®), com grau de pureza superior a 99%.

#### 3.3 SOLVENTES E REAGENTES

Para realização da validação da metodologia bioanalítica, foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: acetato de etila grau HPLC (Vetec®), metanol grau HPLC (Vetec®), ácido trifluoroacético (TFA) (Vetec®), éter dietílico grau HPLC (Vetec®), acetonitrila grau HPLC (Vetec®), acetato de amônia (Vetec®), hidróxido de amônio (Vetec®), cloreto de sódio (Impex®), água ultrapura (milli-Q, Millipore®).

### 3.4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

As análises foram realizadas em UPLC-MS/MS Shimadzu®, constituído por bombas LC-20 AD, injetor automático SIL-20 AHT, forno para coluna CTO-20-A, controladora CBM-20A, detector triplo quadrupolo LCMS-8030 e *software* LabSolution (Shimadzu®). Além do UPLC-MS/MS, foram utilizados diversos tipos de equipamentos e materiais (Tabela 1) para a validação.

TABELA 1 - Equipamentos e materiais utilizados para a validação.

Equipamento/acessório	Marca	Modelo/Descrição	Cidade
Balança analítica	Kern®	410	Una-BA
Agitador vertical	IKA®	VIBRAX VXR basic	Campinas-SP
Banho ultrasônico	Unique®	USC-2800 <sup>a</sup>	Indaiatuba-SP
Banho de água	Novatécnica®	NT 265	Piracicaba-SP
pHmetro	Tecnopon®	-	Piracicaba-SP
Bomba de vácuo	Sparmax®	New pump	São Paulo-SP
Centrífuga	Novatécnica®	NT-811	Piracicaba-SP
Freezer -20°C	Prosdócimo®	F21-smile	Barueri-SP
Ultrafreezer -80°C	Nuaire®	Glacier	Campinas-SP
Pré-coluna	Ace®	C8	São Paulo-SP
Coluna	SHIMADZU®	XR-ODS 100mmX 3mm	São Paulo-SP
Seringa	Bayer®	1mL	São Paulo-SP
Agulha de gavagem	Insight®	IC-810	Ribeirão Preto-SP
Agulha	Ares®	0,30x13 mm	São Paulo-SP
Glicosímetro	Bayer®	Contour TS	São Paulo-SP
Fita para medir glicemia	Bayer®	Contour TS	São Paulo-SP
Guilhotina	Insight®	EB-271	Ribeirão Preto-SP
Purificador de água do tipo Milli-Q	Millipore®	Direct16	Molsheim-França

Fonte: Da autora.

## 3.5 ESTUDO EXPERIMENTAL

### 3.5.1 Protocolo de indução do DM

Para indução do DM, após jejum de 15 horas, o antibiótico, na dose de 50 mg/kg, foi administrado em solução tampão citrato de sódio 0,1M pH4,5 por vial.V. O STZ foi preparado no momento da administração, mantido em gelo e protegido da luz, sendo o volume aplicado da solução equivalente ao peso do animal. Passados três dias da administração, a glicemia foi mensurada em Glicosímetro, através de secção da cauda do animal para colheita do sangue. Os animais que apresentaram glicemia superior e ou igual a 200 mg/dL foram considerados diabéticos.

### 3.5.2 Grupos experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 a 250 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais permaneceram em ambiente com controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso à ração e a água.

#### 3.5.2.1 Grupos controle

Grupo Midazolam: Os animais, após jejum de 12 horas, receberam por V.O (gavagem) MDZ dissolvido em solução salina 0,9 % na dose de 20 mg/kg. As amostras de sangue foram colhidas por decapitação nos tempos zero, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 240 minutos e heparina foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados seis animais por tempo de colheita. As amostras foram mantidas a -80°C até análise.

Grupo Metoprolol: Os animais, após jejum de 12 horas, receberam por gavagem cloridrato de MET dissolvido em salina 0,9% na dose de 15 mg/kg. As amostras de sangue foram colhidas por decapitação nos tempos zero, 2, 4, 6, 10, 20, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 minutos após a administração e heparina foi utilizada como anticoagulante. Foram utilizados seis animais por tempo de colheita. As amostras foram mantidas a -80°C até análise.

Grupo Midazolam (diabético): Após indução do DM, os animais foram tratados como o grupo midazolam-controle e amostras foram colhidas nos mesmos intervalo de tempo e armazenadas da mesma maneira.

Grupo Metoprolol (diabético): Após indução do diabetes, os animais foram tratados como o grupo metoprolol-controle e amostras foram colhidas nos mesmos intervalos de tempo e armazenadas da mesma maneira.

As soluções para tratamento dos animais foram preparadas no dia da administração, sendo o volume administrado corrigido pelo peso do animal.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal local sob o número 423/2012 (Anexo I).

### 3.6 ANÁLISE DO METOPROLOL E ALFA-HIDROXIMETOPROLOL EM PLASMA

Foram preparadas soluções-estoque do padrão de MET (1mg/mL), alfa-hidroxi metoprolol (0,1 mg/mL) e padrão interno (PI) propanolol (1mg/mL) em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas para metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol, para construção das curvas analíticas e controles de qualidade em *pool* de plasma branco, e para o propanolol utilizado como PI.

As concentrações da solução de trabalho de MET e alfa-hidroxi metoprolol foram definidas com base nos estudos realizados por Boralli et al. (2005) e preparadas a partir de solução mãe em metanol. O PI foi diluído e utilizado na concentração de 350 ng/mL em metanol.

A curva analítica foi construída por meio do enriquecimento de alíquotas de 500µL de plasma com 25µL de cada solução-padrão, resultando em concentrações plasmáticas de 10 - 750 ng/mL e os controles de qualidade (CQ) a 30, 380, 600 e 750 ng/mL de metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol.

### **3.6.1 Preparo de amostra e análise cromatográfica do metoprolol e seu metabólito**

A determinação do MET e alfa-hidroxi metoprolol em plasma de rato foi realizada baseando-se nos estudos descritos por Yilmaz et al. (2010) e Irena et al. (2011), utilizando extração líquido-líquido para preparo das amostras e separação/quantificação por UPLC-MS/MS. Os parâmetros do UPLC-MS/MS foram otimizados pelo equipamento em etapa inicial.

Em suma, a 500µL de plasma adiciona-se 25 µL de padrão e PI, 0,1 g de cloreto de sódio (NaCl), 200 µL de hidróxido de sódio (1M) e 3 mL de solução éter dietílico:acetato de etila (2:1, v/v). Agitou-se por 15 minutos em agitador vertical (1000 rpm), centrifugou-se a 1800 g por 10 minutos. Alíquotas de 2 mL da fase orgânica foram levadas à secura sob fluxo de nitrogênio e em banho a 35°C, ressuspendidas em 500 µL de metanol para posterior injeção no UPLC-MS/MS.

O método bioanalítico otimizado posteriormente validado que melhor se enquadrou nos parâmetros de validação, está descrito na Tabela 2.

TABELA 2 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em plasma por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	UPLC-MS/MS
Detecção	Metoprolol: 268,20>98,05; 268,20>116,15 268,20>133,15 Alfa-hidroxi metoprolol: 284,20>74,05; 284,20>116,15; 284,20>72,05 PI: 260,10>116,10; 260,20> 98,10; 260,20> 183,15
Coluna analítica	XR-ODS 100 x 3,0 mm
Pré-coluna	Ace C8
Temperatura da coluna	55°
Fase móvel	Metanol: solução de TFA 0,05% (60:40 v/v)
Vazão da fase móvel	0,4 mL/min
Volume de injeção	7 µL
Linearidade	10-750 ng/mL
Tempos de retenção	Metoprolol: 1,5 min Alfa-hidroxi metoprolol: 1,09 min Propanolol: 1,10 min
Tempo de análise	2,01 min
Tipo de integração	Base-a-base
Equação da curva	$y=ax+b$

Fonte: Da autora.

### 3.7 ANÁLISE DO MIDAZOLAM EM PLASMA

Foram preparadas soluções-estoque do padrão de MDZ (1 mg/mL) e padrão interno omeprazol(PI) (1 mg/mL) em metanol e posteriormente diluídas para utilização das soluções de trabalho e CQ em *pool* de plasma branco, e para o omeprazol utilizado como PI.

As concentrações de solução de trabalho do midazolam foram definidas com base nos estudos realizados por Jan-Jurica et al. (2007) e preparadas a partir de solução estoque em metanol. O PI foi diluído e utilizado na concentração de 1000 ng/mL em metanol.

A curva analítica foi construída por meio do enriquecimento de alíquotas de 500µL de plasma branco com 25µL de cada solução-padrão, resultando em concentrações plasmáticas de 10 - 2000 ng/mL de MDZ.

### 3.7.1 Preparo de amostra e análise cromatográfica do midazolam

O preparo de amostra para MDZ em plasma foi realizada da mesma forma que o empregado para o MET/alfa-hidroximetoprolol, com exceção do padrão interno utilizado. A extração líquido-líquido foi efetuada como descrita em 3.6.2 devido às características similares dos analitos de interesse e por apresentar adequada resposta a extração tanto do MDZ como do PI.

Os parâmetros do UPLC foram otimizados pelo equipamento, o método bioanalítico desenvolvido que melhor se enquadrou nos parâmetros de validação, está descrito na Tabela 3.

TABELA 3 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de midazolam em plasma por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	UPLC-MS/MS
Detecção	Midazolam: 326,00>291,10; 326,00>249,05; 326,00>223,00 Omeprazol: 346,00> 198,05; 346,00> 136,10; 346,00>151,05
Coluna analítica	XR-ODS 100 x 3 mm
Pré-coluna	Ace C8
Temperatura da coluna	35°C
Fase móvel	Acetonitrila : solução de acetato de amônia 5mM pH:5 (60:40 v/v)
Vazão da fase móvel	0,5 mL/min
Volume de injeção	50µL
Tempos de retenção	Midazolam: 2,0 min Omeprazol: 1,33 min
Tempo de análise	3,01 min
Tipo de integração	Base-a-base
Equação da curva	y=ax+b

Fonte: Da autora.

## 3.8 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Os métodos foram validados de acordo com a resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA.

### 3.8.1 Curva de calibração

As curvas de calibração foram construídas adicionando-se concentrações conhecidas dos analitos e de PIs. No método desenvolvido para análise de MET/alfa-hidroximetoprolol em plasma de rato seis concentrações distintas (10, 50, 100, 300, 500 e 750 ng/mL) dos analitos de interesse e PI na concentração de 350 ng/mL foram analisadas em sextuplicata. No método desenvolvido para análise de MDZ em plasma de rato as concentrações empregadas foram 10, 50, 100, 200, 800, 2000 ng/mL de MDZ e PI na concentração de 1000 ng/mL, cada ponto foi analisado em sextuplicata. Além destes pontos de concentração conhecida, também foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionadas de PI (amostra zero).

### 3.8.2 Precisão/exatidão

A precisão e a exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas diferentes realizadas em dias subsequentes (intercorridas). Para o estudo de precisão e exatidão amostras adicionadas da substância de interesse, controles de qualidade em três concentrações distintas foram usadas, controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM) e controle de qualidade de alta concentração (CQA), além dos controles também foi analisado o limite inferior de quantificação (LIQ).



As concentrações empregadas para a análise de MET/alfa-hidroximetoprolol foram de 10 ng/mL (LIQ), CQB (30ng/mL), CQM (380ng/mL) e CQA (600 ng/mL) e para o método midazolam de 10 ng/mL (LIQ), CQB (30ng/mL), CQM (380ng/mL) e CQA (600 ng/mL).

Em cada corrida o LIQ, o CQB, CQM e o CQA foram analisados em quintuplicata, sendo aceitos valores de coeficiente de variação (CV) menores ou iguais a 15% para que o método fosse considerado preciso com exceção do LIQ, para o qual o valor de aceitação é menor ou igual a 20%.

Para que o método fosse considerado exato, o erro padrão relativo (EPR) deveria estar na faixa  $\pm 15\%$  do valor nominal, com exceção do LIQ onde são admitidos valores entre  $\pm 20\%$ .

### **3.8.3 Efeito residual**

Para avaliar o efeito residual do método foram feitas três injeções da amostra branco, uma antes da injeção do Limite superior de quantificação (LSQ) e duas após. Para que não exista efeito residual, os resultados obtidos na amostra processada do LIQ e a respostados picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ.

### **3.8.4 Efeito matriz**

O efeito matriz foi feito utilizando se oito amostras de plasma diferentes, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. As matrizes foram processadas e em seguida adicionou-se solução de PI e analito nas mesmas concentrações de CQB e CQA, com  $n=8$  para cada CQ. O cálculo do efeito dos componentes sobre o analito foi realizado de acordo com a fórmula descrita abaixo. São aceitos valores de CV para o fator de matriz normalizado (FMN) menores que 15%.

$$FMN= \frac{\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

### **3.8.5 Estabilidade do analito em matriz biológica**

A estabilidade do analito em matriz biológica foi avaliada em diferentes condições, conforme descritos nos itens de 3.8.5.1 a 3.8.5.5. Foram empregadas cinco amostras de cada controle (CQA e CQB), sendo consideradas estáveis amostras que não apresentem desvio superior a 15% da média.

#### **3.8.5.1 Estabilidade após ciclos de congelamento**

As amostras de CQB e CQA foram analisadas após serem submetidas a três ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}$ , sendo o primeiro de 24 horas e os seguintes de 12 horas. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas de controles recém preparados e analisados na mesma análise cromatográfica.

#### **3.8.5.2 Estabilidade de curta duração**

As amostras recém-preparadas CQA e CQB foram processadas e analisadas após permanecerem por 6 horas em temperatura e luz ambiente ( $24^{\circ}\text{C}$ ). Os resultados obtidos foram comparados com as respostas de controles recém preparados e analisados na mesma análise cromatográfica.

#### 3.8.5.3 Estabilidade de longa duração

As amostras CQA e CQB permaneceram sob mesmas condições e tempo de armazenagem que as amostras, desde a colheita até a análise da última amostra, quatro meses, e foram submetidas ao processo de extração e análise. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas de controles recém preparados e analisados na mesma análise cromatográfica.

#### 3.8.5.4 Estabilidade pós-processamento

As amostras CQA e CQB foram submetidas ao procedimento de extração e permaneceram dentro do auto-injetor por um período de 6 horas, tempo decorrido para análise cromatográfica dos controles, curva analítica e amostras, ao final deste as amostras foram submetidas a análise cromatográfica, os valores foram comparados com os dos controles em curva recém preparada.

#### 3.8.5.5 Estabilidade do analito e PI em solução

As soluções primárias dos analitos e PIs (1 mg/mL) e as soluções de trabalho de média e menor concentração foram analisadas após final do estudo. Os resultados obtidos foram comparados com as respostas de soluções recém preparadas e analisados na mesma análise cromatográfica.

### 3.8.6 Recuperação

A recuperação dos analitos de interesse foi estimada pela adição de contrações conhecidas dos analitos, as mesmas foram determinadas em curva analítica recém preparada. Os resultados foram obtidos através da fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração observada}}{\text{concentração nominal}} \times 100$$

## 3.9 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente.

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

O software WinNolin gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos (GABRIELSON; WEINER, 2000). As estimativas finais incluem a constante velocidade de eliminação ( $K_{el}$ ), o volume aparente de distribuição ( $V_d/f$ ), a meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) e o *clearance* total aparente ( $Cl_T/f$ ). Os parâmetros  $C_{max}$  e  $t_{max}$  foram calculados utilizando as equações padrão do software.

Os parâmetros  $Cl_{T/f}$  do metoprolol e  $AUC^{0-\infty}$  do metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol foram utilizados para avaliar a atividade do CYP 2D6. Os parâmetros  $Cl/f$  e  $AUC^{0-\infty}$  do midazolam foram empregados para avaliar as diferenças entre os grupos diabéticos e controle para determinação da atividade do CYP3A4.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa GraphPad InStat<sup>®</sup> para obtenção da média e intervalo de confiança 95% (IC 95%),

O teste de Mann-Whitney bicaudal para dados não pareados foi empregado para comparar os parâmetros farmacocinéticos dos Grupos controles em relação aos Grupos Diabéticos, no teste estatístico o nível de significância foi fixado  $p \geq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo estão descritos nos itens abaixo.

### 4.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METOPROLOL E ALFA-HIDROXIMETOPROLOL EM PLASMA DE RATO.

O método desenvolvido atende todos os parâmetros de aceitação da RDC 27/2012, apresentou-se linear, preciso e exato, sendo adequado para a quantificação dos analitos de interesse em plasma de rato.

A análise do MET, e alfa-hidroxicetoprolool em plasma de ratos foi realizada após extração líquido-líquido. A separação dos compostos foi obtida utilizando coluna Shim-pack XR-ODS<sup>®</sup> 100 x 3,0 mm, protegida por coluna ACE C8 com fase móvel constituída por Metanol: solução de TFA 0,05% (60:40 v/v). Os cromatogramas apresentados na Figura 3 mostram os picos obtidos para as substâncias analisadas. Cada cromatograma representa um canal (relação m/z) da análise.

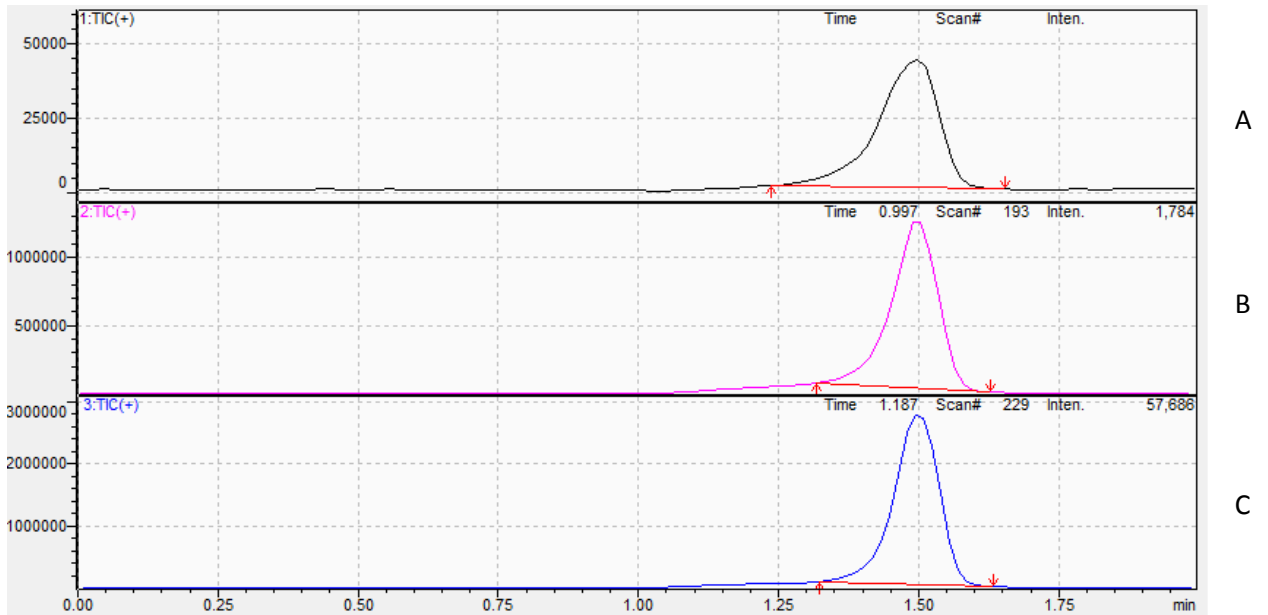


FIGURA 3 - Análise cromatográfica do metoprolol e metabólito: alfa-hidroxi metoprolol (A); metoprolol (B) e PI (C).

FONTE: Da autora.

#### 4.1.1 Linearidade

A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica contendo seis concentrações distintas, variando de 10 a 750 ng/mL em plasma. Os parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol em plasma de rato por UPLC-MS/MS são demonstrados nas Figuras 4 e 5 as quais representam as curvas analíticas resultante da análise de três curvas de calibração realizadas em dias distintos, para cada ponto foram feitas seis réplicas.

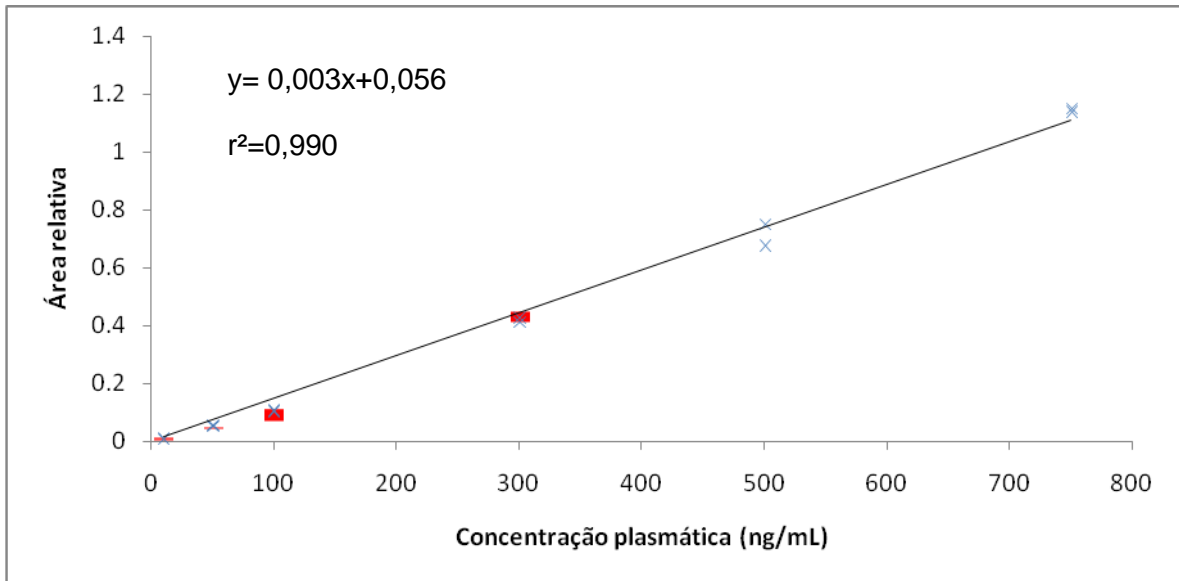


FIGURA 4 - Curva analítica do metoprolol em plasma de rato.

FONTE: Da autora

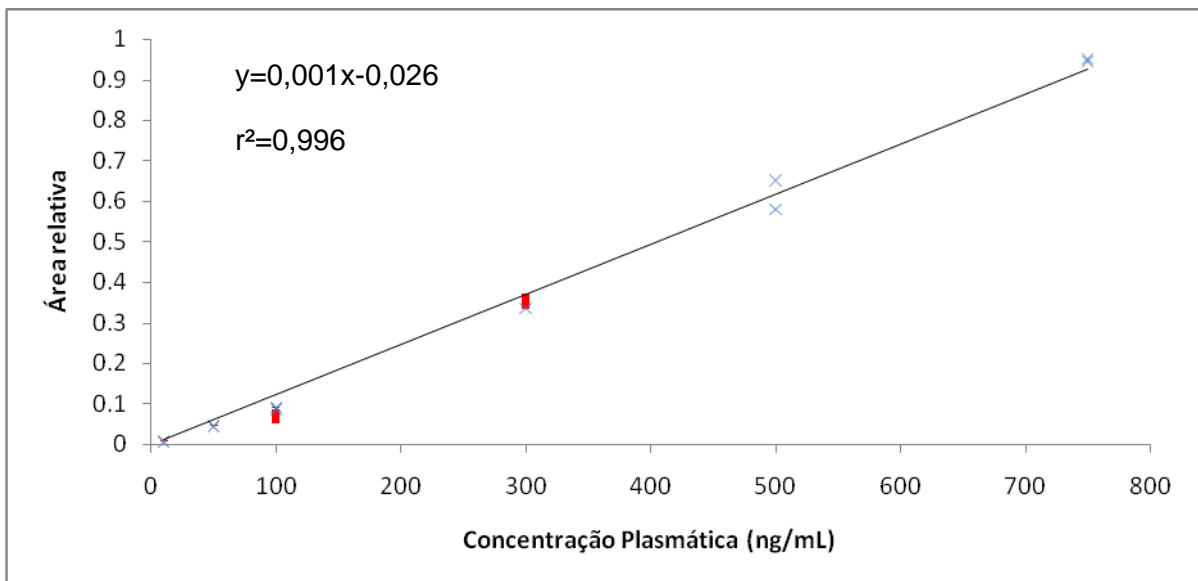


FIGURA 5 - Curva analítica do alfa-hidroxi metoprolol em plasma de rato.

FONTE: Da autora

O método mostrou-se linear na faixa de concentração supracitada, com coeficientes de determinação linear ( $r^2$ ) iguais ou superiores a 0,99.



### 4.1.2 Efeito matriz

O efeito dos componentes de oito matrizes biológicas distintas sobre o analito foi calculado com a relação descrita em 3.8.4. Os resultados dos coeficientes de variação do FMNs estão presentes na Tabela 4.

TABELA 4 - Coeficiente de variação do FMN referente ao método analítico para quantificação de metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol em amostra de plasma.

	Metoprolol	Alfa-hidroxi metoprolol
CQB CV(%)	6,32	14,39
CQA CV(%)	13,71	5,29

Fonte: Da autora.

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$

Pode-se perceber que os componentes endógenos do plasma de rato não possuem efeito de supressão sob o sinal do analito.

### 4.1.3 Efeito residual

Na Figura 6 está demonstrada uma análise cromatográfica do branco após duas injeções do LSQ, sendo A, B e C canais de análises do alfa-hidroxi metoprolol, MET e PI, respectivamente. Observa-se que não ocorreu efeito residual nos tempos de retenção dos analitos, aproximadamente 1,5 min (Figura 3). A variação na linha de base presente no primeiro cromatograma, referente ao alfa-hidroxi metoprolol está dentro dos parâmetros aceitos pela ANVISA, o pico interferente apresentou resposta inferior a 20% da resposta do LIQ.

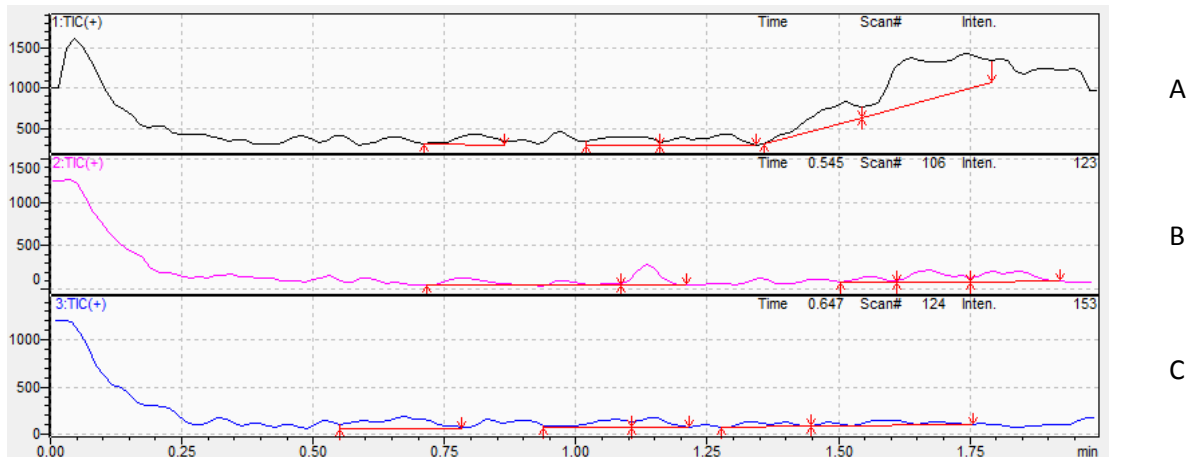


FIGURA 6 - Análise cromatográfica da amostra branco após duas injeções do LSQ, alfa-hidroxi metoprolol (A), metoprolol (B), PI (C).

FONTE: Da autora.

#### 4.1.4 Precisão/exatidão

Foi determinada a precisão e exatidão intracorridas e intercorridas para o MET e alfa-hidroxi metoprolol e os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Pode-se observar pelos resultados que o método pode ser considerado preciso e exato.

TABELA 5 - Precisão e exatidão intracorrida e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de metoprolol em plasma.

	LIQ	CQB	CQM	CQA
<b>Intercorrida</b>				
Precisão (CV%)	12,46	11,37	10,18	12,93
Exatidão (Inexatidão %)	3,27	10,52	4,08	0,98
<b>Intracorrida</b>				
Precisão (CV%) n=5	18,76	12,69	11,21	11,31
Exatidão (Inexatidão %)	11,64	10,07	8,00	9,65

Fonte: Da autora.

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

TABELA 6 - Precisão e exatidão intracorrida e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de alfa-hidroxi metoprolol em plasma.

	LIQ	CQB	CQM	CQA
<b>Intracorrida</b>				
Precisão (CV%)	12,82	10,66	12,26	12,76
Exatidão (Inexatidão %)	12,26	-0,17	-1,05	2,20
<b>Intercorrida</b>				
Precisão (CV%)	17,82	5,43	11,77	5,37
Exatidão (Inexatidão %)	15,7	-5,47	13,23	1,37

Fonte: Da autora.

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

#### 4.1.5 Estabilidade

O metoprolol e seu metabólito demonstraram estabilidade, estando os desvios dos CQB e CQA dentro dos valores aceitos pela ANVISA (TABELA 7 e 8).

TABELA 7 - Estudo da estabilidade de curta duração, ciclos de congelamento, pós-processamento e longa duração do método de análise do metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol em plasma de rato.

CV(%)	Curta duração (6h)	Ciclos de congelamento (3 ciclos)	Pós processamento (6h)	Longa duração (4 meses)
<b>CQB</b>				
Metoprolol	12,47	10,01	10,60	10,05
Alfa-hidroxi metoprolol	13,96	2,48	12,79	12,94
<b>CQA</b>				
Metoprolol	10,76	10,04	10,29	10,04
Alfa-hidroxi metoprolol	11,64	2,01	10,88	9,06

Fonte: Da autora.

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$ .

TABELA 8 - Estudo estabilidade metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol e PI em solução.

	750 ng/mL CV(%)	380 ng/mL CV(%)	10 ng/mL CV(%)
Metoprolol	9,37	10,39	12,87
Alfa-hidroxi metoprolol	8,96	10,67	13,03
Propranolol (PI)	8,56	9,93	12,56

Fonte: Da autora.

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$

## 4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MIDAZOLAM EM PLASMA DE RATO

O método desenvolvido atendeu todos os parâmetros de aceitação da RDC 27/2012, apresentou-se linear, preciso e exato, sendo adequado para a quantificação dos analitos de interesse em plasma de rato.

A análise do MDZ em plasma de ratos foi realizada após extração líquido-líquido. A separação dos compostos foi obtida utilizando coluna Shim-pack ODS Phenyl® 100 x 3,0 mm, protegida por coluna ACE C8 com fase móvel constituída por acetonitrila: solução de acetato de amônia 5Mm pH 5 (60:40 v/v). Os cromatogramas apresentados na Figura 7 mostram os picos obtidos para as substâncias analisadas.

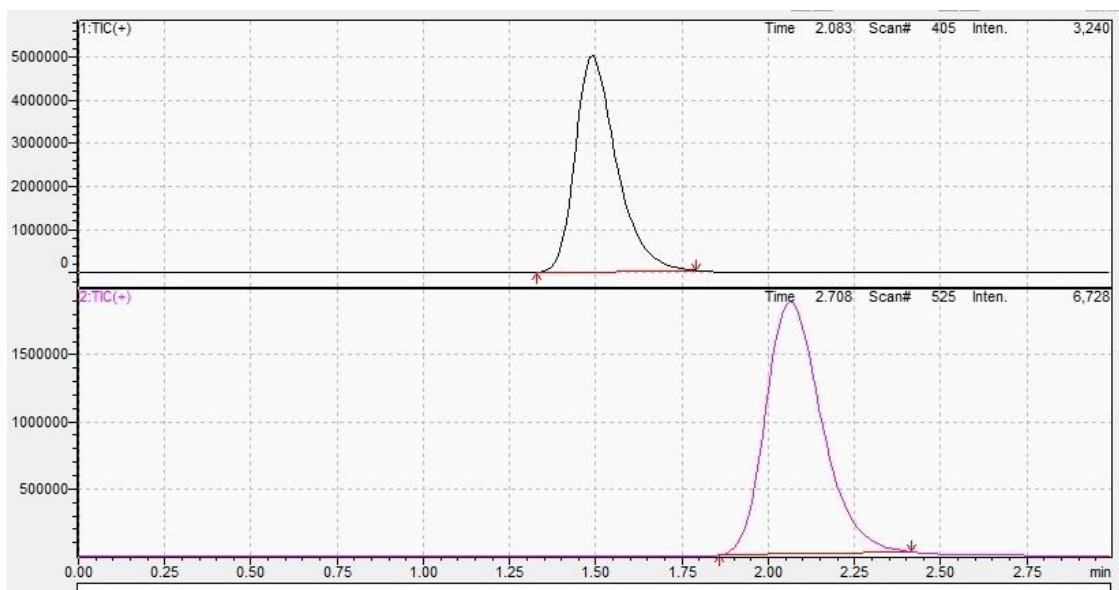


FIGURA 7- Análise cromatográfica do midazolam: PI (A) e Midazolam (B).

FONTE: Da autora.

### 4.2.1 Linearidade

A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica contendo seis concentrações distintas, na faixa de 10 a 2000 ng/mL em plasma. Os parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de MDZ em plasma de rato por UPLC-MS/MS estão demonstrados na Figura 8, que representa a curva analítica resultante da análise de curvas realizadas em três dias distintos, em sextuplicata para cada concentração.

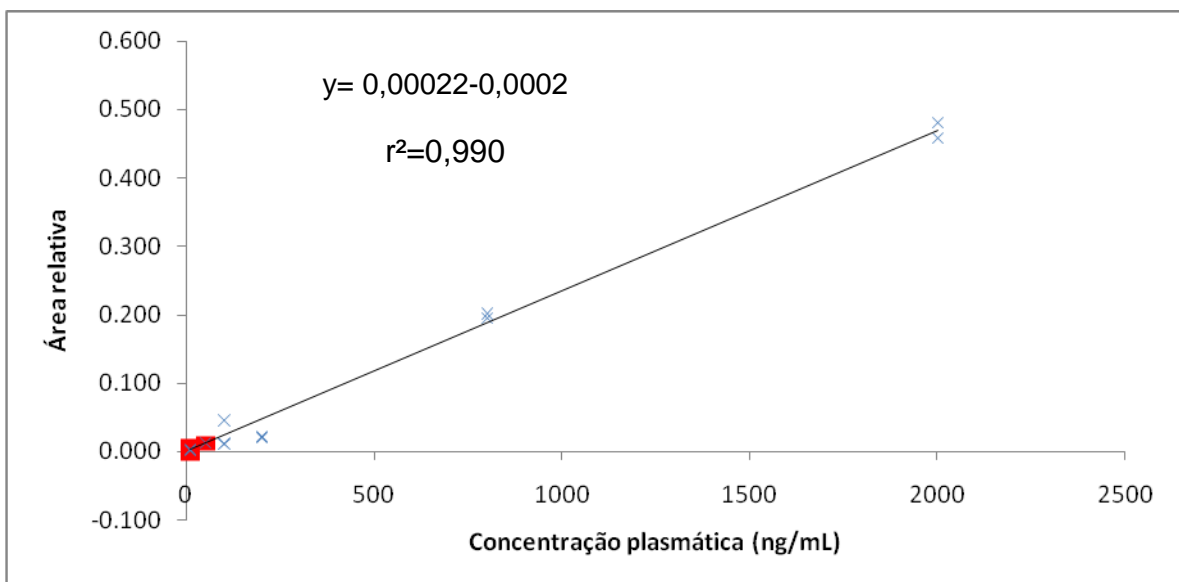


FIGURA 8 - Curva analítica do midazolam em plasma de rato.

FONTE: Da autora.

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 10 a 2000ng/mL de plasma, com coeficiente de determinação linear ( $r^2$ ) 0,99.

#### 4.2.2 Efeito matriz

O efeito dos componentes de oito matrizes biológicas distintas sobre o analito foi calculado com a relação descrita em 3.8.2. Os resultados dos coeficientes de variação do FMNs estão presentes na Tabela 9.

TABELA 9- Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de midazolam em plasma.

	CQB	CQA
CV(%)	8,14	4,61

Fonte: Da autora.

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$ .

#### 4.2.3 Efeito residual

A análise cromatográfica do branco antes e após duas injeções do LSQ demonstrou que não houve efeito residual no método desenvolvido como demonstrado na Figura 9.

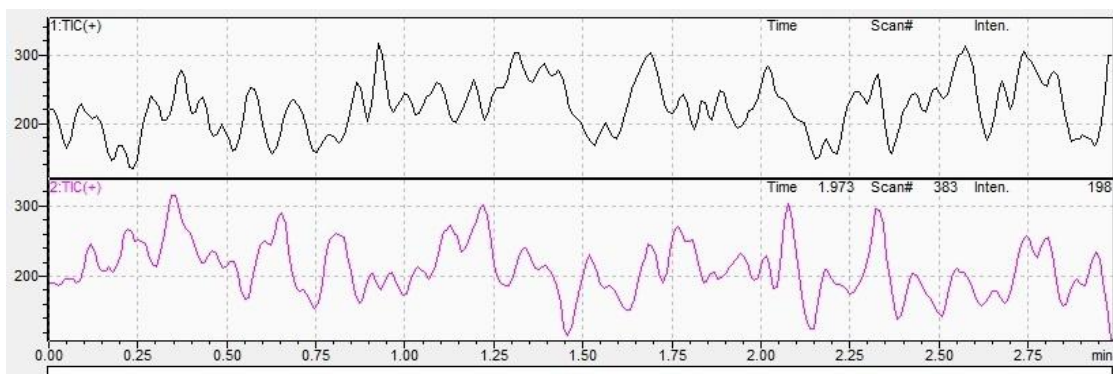


FIGURA 9 - Análise cromatográfica da amostra branco após duas injeções do LSQ.

FONTE: Da autora.

#### 4.2.4 Precisão/Exatidão

Foi determinada a precisão e exatidão intracorrida e intercorrida (Tabela 10) para os controles e para o LIQ. Pode-se observar pelos resultados que o método pode ser considerado preciso e exato.

TABELA 10 - Precisão e exatidão intracorrida e intercorrida referente ao método analítico para quantificação de midazolam em plasma.

	LIQ	CQB	CQM	CQA
<b>Intracorrida</b>				
Precisão (CV%)	13,80	8,68	6,35	10,76
Exatidão (Inexatidão %)	9,04	-4,29	ici3,45	5,54
<b>Intercorrida</b>				
Precisão (CV%)	16,29	14,44	8,66	8,86
Exatidão (Inexatidão %)	11,88	5,49	6,45	3,91

Fonte: Da autora.

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

#### 4.2.5 Estabilidade

O método demonstrou ser estável em todos os testes de estabilidade. Os resultados estão presentes nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 - Estudo da estabilidade de curta duração, ciclos de congelamento, pós-processamento e longa duração do método de análise do midazolam em plasma de rato.

	Curta duração (6h)	Ciclos de congelamento (3 ciclos)	Pós processamento (6h)	Longa duração (4 meses)
CQBCV(%)	12,67	11,89	9,93	10,63
CQA CV(%)	2,49	9,76	12,64	9,89

Fonte: Da autora.

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$

TABELA 12 - Estudo estabilidade do midazolam e PI em solução.

	2000 ng/mL CV(%)	380 ng/mL CV(%)	10 ng/mL CV(%)
Midazolam	6,79	8,65	10,45
Omeprazol (PI)	7,51	8,28	9,78

Fonte: Da autora

Nota: CV = coeficiente de variação  $[(SD/ \text{média}) \times 100]$

#### 4.2.6 Recuperação

Ambos os métodos apresentaram recuperação adequada. O método desenvolvido para análise de midazolam em plasma de rato teve como resposta 87 % e para a análise de metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol os resultados obtidos foram de 89% e 86% respectivamente.

### 4.3 ESTUDO EXPERIMENTAL

Os resultados obtidos no estudo experimental em ratos estão descritos nos itens abaixo.

#### 4.3.1 Farmacocinética do metoprolol e metabólito em ratos

O método desenvolvido para quantificação de MET/alfa-hidroxi metoprolol foi aplicado às amostras de animais tratados com MET nos grupos diabético e controle. Os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 13 e 14 e os perfis de concentração plasmática em função do tempo estão representados nas Figuras de 10 e 11. Para o estudo farmacocinético do metoprolol, o modelo que melhor se adequou foi bicompartimental, já para o alfa-hidroxi metoprolol mais adequado foi o monocompartimental.



TABELA 13 - Parâmetros farmacocinéticos (AUC e Cl/f) para metoprolol administrado por VO em ratos (dose= 15 mg/Kg). Média, Intervalo de confiança (IC), n=6 para cada tempo.

Parâmetro	Controle	Diabético	Valor de p
AUC (h.ng/mL)	348,45;*	998,09;	0,0043
	229,82-467,07	472,44-1523,70	
Cl <sub>T</sub> /f (L/h/kg)	46,85;*	17,80;	0,0043
	31,32-62,39	9,96-25,65	

Fonte: Da autora

Nota: \*Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados, p<0,05, IC 95%.

TABELA 14 - Parâmetro farmacocinético (AUC) para alfa-hidroxi metoprolol administrado por VO em ratos (dose= 15,9). Média, IC, n=6 para cada tempo.

Parâmetros	Controle	Diabético	Valor de p
AUC (h.ng/mL)	1533,1;	1179,44;	0,6991
	56,16- 3122,3	828,80-1530,0	

Fonte: Da autora.

Nota: \*Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados, p<0,05, IC 95%.

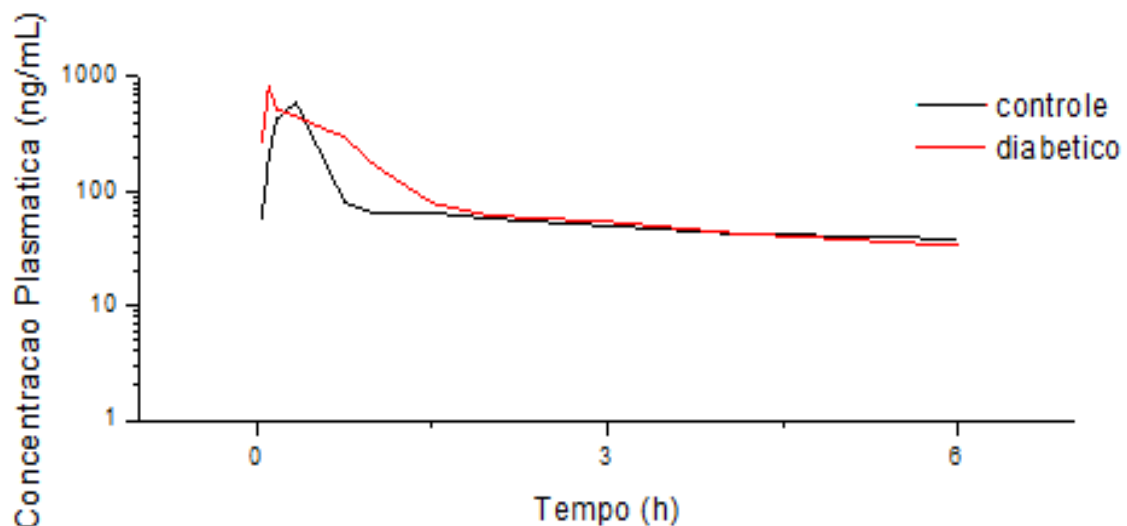


FIGURA 10 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo para grupo metoprolol controle (preto), grupo metoprolol diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).

FONTE: Da autora.

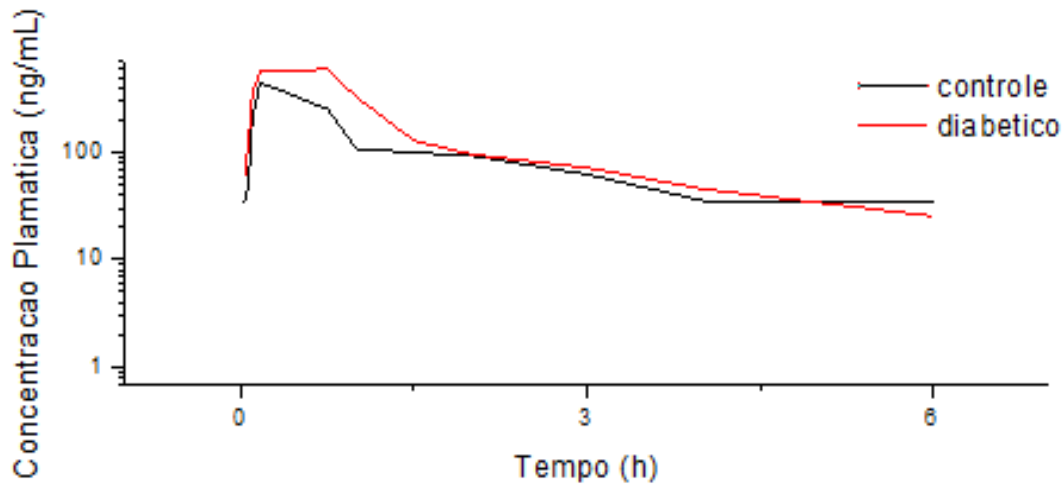


FIGURA 11 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo alfa-hidroxitoprolool grupo controle (preto) e grupo diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).

FONTE: Da autora.

#### 4.3.2 Farmacocinética do midazolam em ratos

O método desenvolvido para quantificação de MDZ foi aplicado aos grupos de animais tratados com MDZ diabético e não-diabético (controle). Os valores para o estudo da farmacocinética do MDZ estão apresentados na Tabela 15. Os perfis de concentração plasmática em função do tempo estão representados na Figura 12 e 15. Para o estudo farmacocinético, o modelo que melhor se adequou aos resultados foi o monocompartimental.

TABELA 15 - Parâmetros farmacocinéticos (AUC e  $Cl/f$ ) para midazolam administrado por VO em ratos (dose= 20 mg/Kg). Média, Intervalo de confiança (IC), n=6 para cada tempo.

Parâmetros	Controle	Diabético	Valor de p
AUC (h.ng/mL)	402,66;* 269,11-536,21	1742,60; 1258,0-2227,2	0,0022
$Cl_{T/f}$ (L/h/kg)	54,01;* 36,41-71,61	12,24; 8,53- 15,96	0,0022

Fonte: Da autora.

Nota: \*Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados,  $p < 0,05$ , IC 95%.

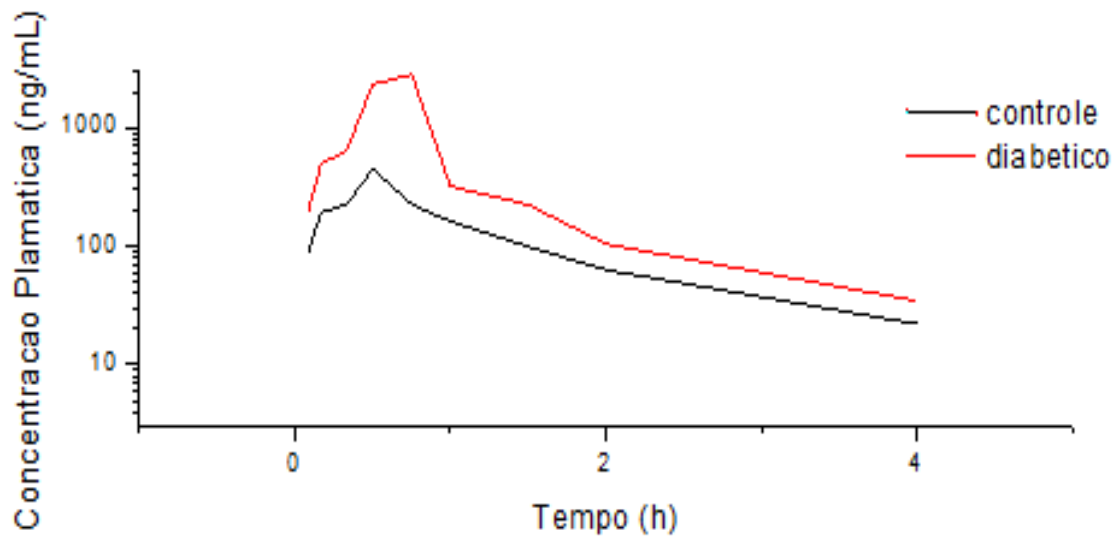


FIGURA 12 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo midazolam grupo controle (preto), grupo diabético (vermelho) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo).

FONTE: Da autora.

## 5 DISCUSSÃO

O MET e o MDZ são substâncias que podem ser utilizadas para mensurar a atividade do CYP2D6 e 3A4 respectivamente (*probe drugs*). Para avaliar a farmacocinética dos marcadores é necessário método de análise que apresente sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Os métodos de análise do MET e do MDZ foram desenvolvidos e validados baseando-se em métodos já existentes na literatura (IRENA; SYLWIA; JACEK, 2011; SAUVE; LANGØDEGÅRD; EKEBERG; ØIESTAD, 2012)

Os métodos desenvolvidos para análise de metoprolol/alfa-hidroxi metoprolol e midazolam em plasma de rato demonstraram linearidade com  $r^2$  maior ou igual a 0,99 (Figuras 4, 5 e 8); os intervalos lineares abrangem as concentrações experimentais encontradas em plasma de rato. Os CV obtidos nos estudos de precisão e exatidão inter e intracorrida (TABELAS 5, 6 e 10) estão de acordo com os parâmetros de aceitação recomendados pela ANVISA assegurando a repetibilidade dos resultados.

O limite inferior de quantificação do fármaco é um parâmetro de importância significativa, uma vez que para mensurar a atividade do CYP, foi administrada dose única de cada marcador aos animais. Para estudos de farmacocinética e metabolismo, é necessário que o método seja preciso e exato, e com valores de LIQ adequados e suficientes para estudos de farmacocinética e metabolismo (10ng/mL), como os apresentados em ambos os métodos desenvolvidos e validados.

Os estudos de estabilidade asseguraram que as amostras podem ser armazenadas por até quatro meses após a colheita (TABELAS 7 e 11). Os resultados de efeito matriz (TABELAS 4 e 9) demonstram que a matriz biológica não exerce efeito na resposta dos analitos e PIs. As Figuras 6 e 9 demonstram a ausência do efeito *carryover* nas metodologias desenvolvidas.

Na análise cromatográfica do MET/alfa-hidroxi metoprolol (Figura 3) os analitos apresentam tempos de retenção muito próximos. Em cromatografia líquida acoplada à fluorescência ou UV este seria um fator limitante para a quantificação e identificação dos analitos, porém na cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à MS/MS os analitos possuem mesmo tempo de retenção não interfere

na quantificação e identificação, pois as áreas são mensuradas de acordo com a relação m/z de cada analito.

O preparo de amostra em matriz biológica é etapa crítica para uma adequada recuperação do analito e eliminar interferentes da matriz diminuindo assim os efeitos da mesma na análise cromatográfica. O método de extração líquido-líquido usando éter dietílico:acetato de etila (2:1; v/v) apresentou recuperação acima de 80% , como descrito 4.2.6, para os dois métodos desenvolvidos. Outra vantagem da extração otimizada é a simplicidade da extração, com poucas etapas e de fácil aplicação em estudos com grande volume de amostras.

A maioria dos métodos de análise de MET em plasma mostraram um tempo total de análise cromatográfica superior a quatro minutos (WREN; TCHELITCHEFF, 2006; LIU et al., 2013). Quando se analisa apenas o tempo de detecção do MET, o método desenvolvido é um dos mais rápidos presentes na literatura; com tempo de retenção do MET de 1,5 min. Outro método já publicado apresentou tempo de retenção de 1,3 min para o MET (SESHADRI et al., 2010). No entanto, este método apresenta faixa de trabalho de 105-840 ng/mL, não sendo aplicável em estudos farmacocinéticos e de metabolismo, onde são necessários limites de quantificação menores.

Métodos para identificação e quantificação de MDZ frequentemente estão associados aos demais benzodiazepínicos (métodos multi-analitos), fazendo com que a análise cromatográfica seja longa, para UPLC. (7 min) (KIRSTENWIESE et al., 2010; SAUVE et al., 2012). A análise desenvolvida neste estudo teve tempo total de 3,01min, sendo o tempo de retenção do MDZ de 2 minutos. Aleksanteri et al (2008) desenvolveram metodologia de identificação de nove fármacos marcadores em urina de CYP450 com tempo total de análise cromatográfica de 12 min e tempo de retenção para o MDZ de 2,37min. Sendo assim, a metodologia desenvolvida figura entre as de menor tempo de análise cromatográfica de MDZ.

O DM é um dos problemas de saúde pública mais significativo na população mundial. O número de pacientes que apresentam diabetes tem aumentado devido aos elevados índices de sedentarismo e obesidade (WILD et al.,2004). Dados epidemiológicos demonstram que, em grande maioria, os portadores apresentam faixa etária entre 45 a 65 anos nos países em desenvolvimento, enquanto que nos países desenvolvidos possuem 65 anos ou mais (KING; REWERS, 1993; KING; AUBERT; HERMAN, 1998). Embora o DM2 seja considerado uma patologia da

terceira idade, o número de casos em jovens tem aumentado significativamente (ARSLANIAN, 2002).

O aumento da mortalidade e morbidade devido às complicações ligadas ao DM é uma das maiores preocupações desta patologia; estas se associam principalmente às complicações macrovasculares (infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral) e microvasculares (nefropatias, neuropatias, retinopatias) (ENGELGAU et al., 2004).

O DM afeta o metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, bem como sistemas envolvidos na biotransformação. Desta maneira, altera a farmacocinética de vários compostos podendo modificar: a absorção, devido a uma alteração do fluxo sanguíneo subcutâneo/muscular e aumento no tempo de esvaziamento gástrico; a distribuição, ocasionado pela glicação não enzimática de proteínas entre elas a albumina; a biotransformação, por alterações em enzimas envolvidas no processo e transporte de fármacos e a excreção, ocasionado por alterações microvasculares. As alterações macro e microvasculares decorrentes da progressão do DM tem importância pronunciada à longo prazo (DOSTALEK et al., 2012).

Alterações na absorção de compostos ocorrem, pois o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica está reduzido em portadores da patologia (ZHU, 1993), como consequência mudança na secreção de ácidos gástricos e pH do meio (JACOBSON; LINFORD; GROSSMAN, 1966; JACOBSON; CHANGALVIN, 1969; MOODY, 1968; HASLER et al., 2008). O DM1 e DM2 provoca alteração no tempo do esvaziamento epigástrico e trânsito intestinal (KESHAVARZIAN; IBER; VAETH, 1987; DUTTA et al., 1999; STACHER, 2001), no entanto, a relação entre atraso no esvaziamento e os sintomas causados é variada (HOROWITZ; FRASER, 1994; KONG; HOROWITZ, 1999; KAREN et al., 2001). Adithan et al. (1989) relatam redução na absorção da ampicilina quando administrada V.O em portadores de DM 2. Outras consequências das alterações micro e macrovasculares podem ser hiperfiltração e o aumento da taxa de filtração glomerular (GILL, 1994; MEEME; HANNINGTON, 2009).

O volume de distribuição de fármacos está intimamente relacionado com o peso. A obesidade é um dos fatores causais para desenvolvimento do DM2, sendo assim, o volume de distribuição de fármacos lipofílicos é afetado pela patologia (BONADONNA et al., 1990; REXRODE et al., 1996). Por outro lado, a obesidade não afeta a ligação fármaco-albumina e a albumina sérica (HANLEY; ABERNETHY; GREENBLATT, 2010). Os altos níveis de açúcar no sangue levam a glicação não enzimática de proteínas incluindo a albumina. Esta situação produz alterações

conformacionais na estrutura da albumina, acarretando algumas vezes em aumento da fração livre de fármacos ácidos em pacientes com DM1 e DM2 (KELLER et al., 1984; KEMP; KEARNS; TURLEY, 1987; KEARNS et al., 1988; ZINIROLAND et al., 1990; TROVIK et al., 1992; TROVIK et al., 1994).

A biotransformação dos fármacos em pacientes obesos é incerta, os efeitos da obesidade sobre o CYP450 possivelmente são específicos para cada isoforma (DOSTALEK et al., 2012)

A biotransformação hepática em pacientes diabéticos apresenta estudos pontuais (CHENG; MORGAN, 2001). Pouco se conhece sobre relação entre a atividade das enzimas envolvidas na biotransformação e o DM. Aparentemente, a patologia não-compensada leva a aumento do conteúdo total de CYP450 e um decréscimo nas enzimas de fase II (DOSTALEK et al., 2012). Exames de biópsia realizados em pacientes diabéticos mostraram que o conteúdo de CYP hepático total aumentou no DM 1 e diminuiu no DM 2 (SOTANIEMI et al., 2002).

Grande parte dos estudos realizados relata o efeito do DM na atividade da isoforma CYP2E1, porém são contraditórios em inferir se o DM afeta a expressão ou atividade desta isoforma (SONG; VEECH; SAENGER, 1990; LUCAS et al., 1998). Vários estudos também verificaram o efeito do DM no *clearance* da teofilina ou da cafeína, para avaliação de atividade de CYP1A2, e demonstraram que não há diferença entre portadores dos tipos 1 ou 2 e não diabéticos (KORRAPATI; VESTAL; LOI, 1995; MATZKE et al., 2000). No que diz respeito à isoforma CYP2C9 (UEDA et al., 1963) e CYP1A1 (SOTANIEMI et al., 2002), o estado patológico não altera a expressão e ou atividade enzimática.

Para mensurar a influência do DM sobre as isoformas do CYP450, pode-se avaliar através do fenótipo se houve alteração da atividade. As ferramentas utilizadas nestes estudos são marcadores validados para a isoforma de interesse, também conhecidos como *probe drugs*, que são fármacos metabolizados predominantemente ou exclusivamente metabolizados por uma única enzima do CYP. Os fármacos MDZ e o MET podem ser empregados como marcadores para o CYP3A4 e CYP2D6 respectivamente (FRYE, 2004).

O MET é um fármaco administrado sob forma racêmica e eliminado principalmente por metabolismo oxidativo, traduzido por O-desmetilação,  $\alpha$ -hidroxilação e N- desalquilação, sendo 70% metabolizado via CYP2D6 (MURTHY et al., 1990). Segundo Boralli et al. (2009) outras isoformas participam do metabolismo

do metoprolol (Figura 1), como o CYP3A4, porém o metabólito gerado pela  $\alpha$ -hidroxilação (alfa-hidroximetoprolol) é exclusivamente formado pelo CYP2D6.

O estudo metabolismo do MET (TABELA 11) mostrou um aumento significativo do AUC do grupo diabético em relação ao controle (348,45 vs 998,09 h.ng/mL). Esta situação pode ser explicada pela redução do  $Cl_{T/f}$  observada no grupo diabético, 17,80 L/h/kg quando comparados ao grupo controle (46,85 L/h/kg). Além disso, observou-se aumento significativo do  $C_{max}$  do grupo diabético, quando comparado ao controle (198,33 vs 1093,20ng/mL). Percebe-se, desta maneira, que o DM induzido experimentalmente resultou em aumento da biodisponibilidade do MET.

Porém, ao observar-se o  $AUC^{0-\infty}$  do alfa-hidroximetoprolol, não foram observadas quaisquer alterações significativas (TABELA 12). Caso o DM tivesse efeito indutor ou inibidor da isoforma 2D6, seria observado redução ou aumento do AUC deste metabólito, explicado por alterações observadas no  $Cl_{T/f}$  do metoprolol. O principal metabólito formado na oxidação do MET, o ácido O-desmetilmetoprolóico, tem as isoforma 2D e 3A envolvidas em sua formação (BORALLI et al., 2009). Sendo assim, o acúmulo de MET inalterado pode ser explicado por inibição da formação do metabólito quantitativamente mais importante, pelo DM, inibindo a isoforma 3A. Esta inibição da isoforma 3A pelo DM é fundamentada nos dados obtidos neste estudo na avaliação farmacocinética do MDZ.

O MDZ é predominantemente metabolizado por oxidação hepática a 1'-hidroximidazolam e 4'-hidroximidazolam, sendo o primeiro metabólito o mais importante quantitativamente, e que contribui para o efeito farmacodinâmico do fármaco (HOVI-VIANDER et al., 1985). Segundo Tucker; Houston; Huang (2001) o MDZ é o principal marcador da atividade do CYP3A4. Os parâmetros farmacocinéticos *clearance* e AUC do fármaco fornecem uma avaliação precisão da atividade do CYP3A (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

O estudo farmacocinético do MDZ (TABELA 13) evidenciou uma redução significativa (54,01 vs 12,24L/h/kg) do  $Cl_{T/f}$  nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle; como consequência, houve aumento significativo (402,66 vs 1742,60 h.ng/mL) do AUC no grupo diabético em relação ao controle. Para os demais parâmetros, não foram observadas diferenças estatísticas



significativas. Pode-se inferir, com os dados obtidos, que o DM induzido experimentalmente e não compensado, pode reduzir a atividade do CYP3A4. Esses dados estão de acordo com outros previamente reportados na literatura, onde observou-se inibição da atividade hepática da isoforma 3A4 (DOSTALEK et al., 2011), bem como redução na biotransformação da lidocaína (marcador não validado da subfamília CYP3A) (MARQUES et al., 2002; DANTAS et al., 2008).

Devido às complicações geradas pela patologia, a situação de politerapia medicamentos a torna-se comum em pacientes portadores de DM e, quando estes pacientes são comparados à população de mesma faixa etária não portadora da patologia, percebe-se claramente a maior utilização de medicamentos pelos portadores da mesma (RENDELL et al., 1983; ISACSON et al., 1987). As alterações micro e macrovasculares causadas pela patologia podem alterar a farmacocinética dos fármacos, alterando a absorção, a distribuição, a biotransformação e a excreção dos fármacos administrados aos pacientes portadores de DM (DOSTALEK et al., 2012).

Alterações de atividade no CYP2D6 podem possuir relevante importância clínica, pois esta isoforma metaboliza vários fármacos, componentes endógenos e a maioria dos  $\beta$ -bloqueadores (RENDIC, 2002). A atividade do CYP3A4 pode determinar a eficácia terapêutica dos fármacos, uma vez que a isoforma metaboliza 50% dos fármacos utilizados (WILKINSON, 1996; RENDIC, 2002). Mudanças na atividade das isoformas irão refletir em alterações no metabolismo dos fármacos administrados para controle das comorbidades do DM, podendo levar à alterações também farmacodinâmicas (BRIAN; LAURENCE; KONSTANTINOS, 2006).

Grande parte dos estudos experimentais que possuem a finalidade mensurar a ação do DM sobre a atividade do CYP450 utilizam fármacos considerados marcadores não validados para a isoforma alvo (DYER, 1994; MARQUES et al., 2002; DANTAS et al., 2008) o que pode levar a resultados não específicos. Os fármacos escolhidos como marcadores de atividade do CYP3A4 e CYP2D6 são considerados marcadores validados para tais isoformas (SOHN et al., 1992; ALEKSANTERI et al., 2008), sendo assim a atividade mensurada corresponde ao CYP de interesse.

Dadas as comorbidades apresentadas pelos portadores de DM e a politerapia observada nestes pacientes, este estudo, através de marcadores validados, pode ajudar no entendimento de situações observadas na terapêutica, em situações de

DM não compensado, onde fármacos metabolizados pela isoforma CYP3A4, podem sofrer acúmulo no organismo e em algumas situações, apresentar efeitos tóxicos decorrentes da inibição enzimática.

## 6 CONCLUSÃO

Os métodos bioanalíticos desenvolvidos e validados para quantificação de metoprolol/alfa-hidroximetoprolol e midazolam em plasma de rato demonstraram adequada detectabilidade, precisão, exatidão e baixo tempo de corrida analítica.

O estudo farmacocinético e de metabolismo do MET sugere que o DM não exerce influência na atividade do CYP2D6 em ratos e os resultados farmacocinéticos do MDZ sugerem que o DM induzido experimentalmente em ratos reduz atividade da isoforma CYP3A4.

## REFERÊNCIAS

- ADITHAN, C. et al. Differential effect of type I and type II diabetes mellitus on antipyrine elimination. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, Barcelona, v. 12, n. 11, p. 755-758, 1989.
- AKLILLU, E. et al. Frequent distribution of ultra rapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 278, n.5, p. 441-446, 1996.
- ALEKSANTERI, P. et al. Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry utilizing 2µm particle size column. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 1215, n. 1-2, p.107-115, 2008.
- ANGELA, S. et al. Enantiospecific pharmacokinetics of metoprolol in CYP2D6 ultra-rapid metabolizers and correlation with exercise induced heart rate. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 187, n. 64, p. 883-888, 2008.
- ARSLANIAN, S. Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. **Horm. Res.**, Pittsburgh, v. 57, n. 1, p. 19-28, 2002.
- BERTILSSON, L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. **Clin. Pharmacokinetic.**, Nova York, v.29, n. 6, p.192-209, 1985.
- BONADONNA, R. C. et al. Obesity and insulin resistance in humans: A dose-response study. **Metabolism.**, Nova York, v. 39, n. 5, p. 452-459, 1990.
- BORALLI, V. B. et al. Stereoselective analysis of metoprolol and its metabolites in rat plasma with application to oxidative metabolism. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, Amsterdam, v. 823, n.2, p. 195-202, 2005.
- BORALLI, V. B; COELHO, E. B; LANCHOTE, V. L. Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. **Chirality.**, Nova York, v. 21, n. 10, p. 886-893, 2009.
- BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. **Pharmacokinetics: Principles and applications.** New York: Mc Graw-Hill, 2002. cap. 17, p. 331-341.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC27, de 17 de maio de 2012: Guia para validação de métodos bioanalíticos.**

2012, Brasília, 17 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diabetes.** Disponível em: <www.saude.gov.br>.

Acesso em: 10 maio, 2013.

BRIAN, D. J.; LAURENCE, J. E.; KONSTANTINOS, N. L. The AmpliChip CYP450 Test: Principles, Challenges, and Future Clinical Utility in Digestive Disease. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, Philadelphia, v. 4, n. 7, p. 822-830, 2006.

BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide and acetonitrile in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. **Drug. Metab. Dispos.**, Bethesda, v.127, n. 27, p. 246-249, 1999.

CERQUEIRA, P. M. et al. Stereoselective metabolism of metoprolol: enantioselective analysis of  $\alpha$ -hydroxymetoprolol in plasma and urine. **Chirality**, Nova York, v.15, n. 6, p.542-249, 2003.

CHENG, P-Y.; MORGAN, E. T. Hepatic Cytochrome P450 Regulation in Disease States. **Curr. Drug. Metab.**, Hilversum, v. 2, n. 2, p. 165-183, 2001.

CHOVAN, J. P.; RING, S. C.; YU, E.; BALDINO, J. P. Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. **Xenobiotica**, Londres, v. 5, n. 37, p. 459-473, 2007.

DANTAS, M. E. C. D. et al. Pharmacokinetics of lidocaine and its metabolite in peridural anesthesia administered to pregnant women with gestational diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Gewerbestrasse, v. 64, n. 12, p. 1189-1196, 2008.

DAHL, M. L. et al. Ultra rapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 274, n. 6, p.516-520, 1995.

DOSTALEK, M. et al. Significantly reduced cytochrome P450 3A4 expression and activity in liver from humans with diabetes mellitus. **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v. 163, n. 5, p. 937-947, 2011.

DOSTALEK, M. et al. Effect of Diabetes Mellitus on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of drug. **Clin. Pharmacokinet.**, Nova York, v. 51, n. 8, p. 481-499, 2012.

DUTTA, U. et al. Double blind controlled trial of effect of cisapride on gastric emptying in diabetics. **Trop. Gastroenterol.**, Nova Delhi, v. 20, n. 3, p. 116-119, 1999.

- DYER, J. R. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of quinine in the diabetic and non-diabetic elderly. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Londres, v. 38, n. 3, p. 205-212, 1994.
- EAP, C. B. et al. Pharmacokinetics of midazolam in CYP3A4 and CYP3A5-genotyped subjects. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 231-236, 2004.
- ENGELGAU, M. M. et al. The Evolving Diabetes Burden in the United States. **Ann. Inter. Med.**, Philadelphia, v. 140, n. 11, p. 945-950, 2004.
- ERIKO, K. et al. Metabolic Disposition of Imipramine in Oriental Subjects: Relation to Metoprolol  $\alpha$ -Hydroxylation and S-Mephenytoin 4'-Hydroxylation Phenotypes1. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 271, n. 2, p.860-867, 1994.
- FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. **Índices do Diabetes Mellitus no mundo**. Disponível em: <<http://www.idf.org/>>. Acesso em: 01 jul. 2013.
- FENG, G. et al. Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Nova York, v.52, n.12, p.149-154, 2010.
- FRYE, R. F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes. **Mol. Interv.**, Bethesda, v. 4, n. 3, p. 157-162, 2004.
- GILL, G. V. Random Blood Glucose Estimation in Type 2 Diabetes: Does it Reflect Overall Glycaemic Control?. **Diabet. Med.**, Nova York, v. 11, n. 7, p. 705-708, 1994.
- GABRIELSSON, J.; WEINER, D. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic data analysis: concepts and applications**. Estocolmo: Swedish Pharmaceutical Press, 2000, 924 p.
- GOURTY, Mc. et al. Metoprolol metabolism and debrisoquine polymorphism-population and family studies. **Br. J.Clin. Pharmacol.**, Londres, v.6, n.20, p. 555-566, 1985.
- GUENGERICH, F. P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** Palo Alto, v. 39, p. 1-17, 1999.
- HANLEY, M. J; ABERNETHY, D. R; GREENBLATT, D.J. Effect of Obesity on the Pharmacokinetics of Drugs in Humans. **Clin. Pharmacokinetics.**, Nova York, v. 49, n. 2, p. 71-87, 2010.
- HANNON-FLETCHER. et al. Lymphocyte cytochrome P450-CYP2E1 expression in human IDDM subjects. **Food. Chem. Toxicol.**, Nova York, v.39, n.2, p.125-132, 2001.

- HASLER, W. L. et al. Differences in intragastric pH in diabetic vs. idiopathic gastroparesis: relation to degree of gastric retention. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, Bethesda, v. 294, n. 6, p. G1384-G1391, 2008.
- HOROWITZ, M.; FRASER, R. Disordered gastric motor function in diabetes mellitus. **Diabetologia**, Berlin, v. 37, n. 6, p. 543-551, 1994.
- HOVI-VIANDER, M. et al. Tofisopam and midazolam: differences in clinical effects and in changes of CSF monoamine metabolites. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Londres, v. 20, n. 5, p. 492-496, 1985.
- IBER, R. et al. Regulation of hepatic cytochrome P450C11 via cAMP: implication for down regulation in diabetes, fasting and inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 297, n. 1, p. 174-180, 2001.
- IRENA, B.; SYLWIA, M.; JACEK, B. UHPLC method for the simultaneous determination of  $\beta$ -blockers, isoflavones and their metabolites in human urine. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, Amsterdam, v. 879, n. 10, p. 615-626, 2011.
- ISACSON, D.; STÅLHAMMAR, J. Prescription drug use among diabetics — A population study. **J. Chronic. Dis.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 651-660, 1987.
- JACOBSON, E. D.; LINFORD, R. H.; GROSSMAN, M. I. Gastric Secretion in Relation to Mucosal Blood Flow Studied by a Clearance Technic. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 45, n. 1, p. 1-13, 1966.
- JACOBSON, E. D.; CHANGALVIN, C. K. Comparison of Gastrin and Histamine on Gastric Mucosal Blood Flow. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v. 130, n. 2, p. 484-486, 1969.
- JAN. J. et al. HPLC determination of midazolam and its three hydroxy metabolites in perfusion medium and plasma from rats. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, Nova York, v. 852, n. 2, p. 571-577, 2007.
- JOHANSSON, I. et al. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450CYP2D locus as a cause of ultra rapid metabolism of debrisoquine. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. A.**, Washington, v. 90, n. 2, p. 11825-11829, 1993.
- KAISARY, A. et al. Genetic predisposition to bladder cancer: ability to hydroxylate debrisoquine and mephenytoin as risk factors. **Cancer Res.**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 5488-5493, 1987.

- KAREN, L. J. et al. Predictors of Delayed Gastric Emptying in Diabetes. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 24, n. 7, p. 1264-1269, 2001.
- KEARNS, G. L. et al. Protein binding of phenytoin and lidocaine in pediatric patients with type I diabetes mellitus. **Dev. Pharmacol. Ther.**, Nova York, v. 11, n. 1, p. 14-23, 1988.
- KELLER, F. et al. Pharmacokinetic effects of altered plasma protein binding of drugs in renal disease. **Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.**, Paris, v. 9, n. 3, p. 275-282, 1984.
- KEMP, S. F.; KEARNS, G. L.; TURLEY, P. Alteration of Phenytoin Binding by Glycosylation of Albumin in IDDM. **Diabetes.**, Alexandria, v. 36, p. 505-509, 1987.
- KESHAVARZIAN, A.; IBER, F. L.; VAETH, J. Gastric emptying in patients with insulin-requiring diabetes mellitus. **Am. J. Gastroenterol.**, Nova York, v. 4, n. 2, p. 29-35, 1987.
- KING, H.; REWERS, M. Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 16, n. 1, p. 157-177, 1993.
- KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.
- KIRSTENWIESE, S. et al. A Validated Method for Simultaneous Screening and Quantification of Twenty-Three Benzodiazepines and Metabolites Plus Zopiclone and Zaleplone in Whole Blood by Liquid-Liquid Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, Oxford, v. 34, p. 332, 2010.
- KOMURA, H.; IWAKI, M. Pharmacokinetics and Metabolism of Metoprolol and Propranolol in the Female DA and Female Wistar Rat: The Female DA Rat Is Not Always an Animal Model for Poor Metabolizers of CYP2D6. **J. Phar. Sci.**, Easton, v. 94, n. 2, p. 397, 2005.
- KONG, M. F.; HOROWITZ, M. Gastric emptying in diabetes mellitus: relationship to blood-glucose control. **Clin. Geriatr. Med.**, Filadélfia, v. 15, n. 2, p. 321-338, 1999.
- KORRAPATI, M. R.; VESTAL, R. E.; LOI, C. M. Theophylline metabolism in healthy nonsmokers and in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin. Pharmacol. Ther.**, Nova York, v. 57, n. 4, p. 413-418, 1995.



- LAMBA, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 1271-1294, 2002.
- LANCHOTE, V. L. et al. Enantioselective analysis of metoprolol in plasma using high-performance liquid chromatographic direct and indirect separations: applications in pharmacokinetics. **J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 738, n. 1, p. 27-37, 2000.
- LEE, S. L.; BERTINO, J. S.; NAFZIGER, A. N. Limited sampling models for oral midazolam: midazolam plasma concentrations, not the ratio of 1-hydroxymidazolam to midazolam plasma concentrations, accurately predicts AUC as a biomarker of CYP3A activity. **J. Clin. Pharmacol.**, Stamford, v. 46, n. 5, p. 229-234, 2006.
- LEHMANN, B.; BOULIEU, R. Determination of midazolam and its unconjugated 1-hydroxy metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v. 168, n. 674, p. 138-142, 1995.
- LIN, Y. P. et al. Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions. **Drug. Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 29, n. 4, p. 368-374, 2001.
- LIU, Y. et al. UPLC-MS-MS Method for Simultaneous Determination of Caffeine, Tolbutamide, Metoprolol, and Dapsone in Rat Plasma and its Application to Cytochrome P450 Activity Study in Rats. **J. Chromatogr. Sci.**, Niles, v. 51, n. 1, p. 26-32, 2013.
- LUCAS, D. et al. Cytochrome P450 2E1 activity in diabetic and obese patients as assessed by chlorzoxazone hydroxylation. **Fund. Clin. Pharmacol.**, Paris, v. 12, n. 5, p. 553-558, 1998.
- LUIGI, Q. et al. Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes. **Biochem. Pharmacol.**, Nova York, v. 75, n. 6, p. 1426-1437, 2008.
- MARQUES, M. P. et al. Dynamic and kinetic disposition of nisoldipine enantiomers in hypertensive patients presenting with type -2 diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 58, n. 5, p. 607-614, 2002.
- MASUTANI, M. et al. Poly (ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin induced diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 96, n. 2, p. 2301-2304, 1998.
- MATERSON, B. J. Variability in response to antihypertensive drugs. **Am. J. Med.**, Nova York, v. 120, n. 4, p. 10-20, 2007.

- MATZKE, G. R. et al. Evaluation of the influence of diabetes mellitus on antipyrine metabolism and CYP1A2 and 2D6 activity. **Pharmac.**, Malden, v.20, n. 2, p.182-190, 2000.
- MEEME, A.; HANNINGTON, K. Effect of glycaemic control on glomerular filtration rate in Diabetes Mellitus patients. **Afr. Health. Sci.**, Kampala, v. 9, n. 1, p. 23-26, 2009.
- MOODY, F. G. Oxygen consumption during thiocyanate inhibition of gastric acid secretion in dogs. **Am. J. Physiol.**, Washington, v. 215,n. 1, p. 127-131, 1968.
- MURTHY, S. S. et al. Enantioselective and diastereoselective aspects of the oxidative metabolism of metoprolol. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1637-1644, 1990.
- NITIN, K.; ROBERT, J. S.; RICHARD, C. B. Mixture Models and Subpopulation Classification: A Pharmacokinetic Simulation Study and Application to Metoprolol CYP2D6 Phenotype. **J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.**, Nova York, v. 34, n. 2, p. 141-156, 2007.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Diabetes**. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)> Acesso em: 07 jul. 2013.
- PAUL, Z.; ALBERTI, K. G. M. M.; JONATHAN, S. Review article Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature.**, Londres, v. 1, n. 414, p.782-787, 2001.
- POGGI, J. C. et al. Enantioselective kinetic disposition of fenoprofen in rats with experimental diabetes or adjuvant-induced arthritis. **Pharmacol.**, Basel, v. 72, n. 2, p. 85-91, 2004.
- PRESTON, R. A; EPSTEIN, M. Effects of diabetes on cardiovascular drug metabolism. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 22, n. 1, p. 982-988, 1999.
- PRESTON, R. A. et al. Effects of severe hypertension in endothelial and platelet microparticles. **Hypertension.**, Dallas, v. 41, n. 1, p. 211-217, 2001.
- QUINNEY, S. K. et al. Interaction between midazolam and clarithromycin in the elderly. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Londres, v. 65, n. 1, p. 98-109, 2008.
- RENDELL, M. et al. A pharmaceutical profile of diabetic patients. **J. Chronic. Dis.**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 193-202, 1983.
- RENDIC, S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. **Drug. Metab. Rev.**, Londres, v. 34, n.1-2, p. 83-448, 2002.

- REXRODE, K. M. et al. Obesity and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Cardiol.**, Filadélfia, v. 11, n. 5, p. 490-495, 1996.
- ROCHA, A.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Stereospecific disposition of fluvastatin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v.80, n. 11, p.1071-1075, 2002.
- SAUVE, E. N; LANGØDEGÅRD, M.; EKEBERG, D.; ØIESTAD, A. M. Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, Amsterdam, v. 883-884, p. 177-188, 2012.
- SCHENKMAN, J. B. Induction of diabetes and evolution of diabetic state on P450 expression. **Meth. Enzymol.**, Nova York, v. 206, n. 1, p. 325-401, 1991.
- SESHADRI, K. R. et al. Simultaneous Quantitative Determination of Metoprolol, Atorvastatin and Ramipril in Capsules by a Validated Stability-Indicating RP-UPLC Method. **Sci. Pharm.**, Althanstraße, v. 78, n. 4, p. 821-834,2010.
- SHIMOJO, N. et al. Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes and levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozocin-induced diabetes. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 621-627, 1993.
- SOCIEDADE AMERICANA DE DIABETES. **Diabetes**. Disponível em: <[www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)>. Acesso em: 07/07/2013.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2009.
- SOHN, D. R. et al. Utility of one-point (3-hour postdose) plasma metabolic ratio as a phenotyping test using metoprolol in two east Asian population. **Ther. Drug. Monit.**, Nova York, v. 14, n. 3, p. 184-189, 1992.
- SONG, B. J.; VEECH, R. L.; SAENGER, P. Cytochrome P450IIE1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Chevy Chase, v. 71, n. 4, p. 1036-1040,1990.
- SOTANIEMI, E. A. et al. Diabetes and elimination of antipyrine in man: an analysis of 298 patients classified by type of diabetes, age, sex, duration of disease and liver involvement. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 90, p. 155-160, 2002.
- STACHER, G. Diabetes Mellitus and the stomach. **Diabetologia**. Berlin, v. 44, n. 9, p. 1080-1093, 2001.

- STREETMAN, D. S.; BERTINO, J. R.; NAFZIGER, A. N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. **Pharmacogenetics.**, Londres, v.10, n. 3, p. 187-216, 2000.
- SURESH, K. et al. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic. **Cardiovasc. Diabetol.**, Virginia, v. 11, n. 09, p. 2-15, 2012.
- TAKUSHI, K. et al. Assessment of the hepatic and intestinal first-pass metoprolol, a CYP2D6 substrate, in Chinese patients with chronic myelogenous leukemia. **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v. 6, n. 65, p. 885-892, 2008.
- THUMMEL, K. E. et al. Use of midazolam as a human cytochrome P4503A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. **J. Pharmacol. Exp. Therapeut.**, Baltimore, v. 271, n. 1, p. 549-556, 1994.
- TROVIK, T. S. et al. Plasma protein binding of catecholamines, prazosin and propranolol in diabetes mellitus. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin. v. 43, p. 265-268, 1992.
- \_\_\_\_\_. Reduced sensitivity to  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation and blockade in insulin dependent diabetic patients with hypoglycaemia unawareness. **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v. 38, n. 2, p. 427-432, 1994.
- TUCKER, G. T. et al. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine. **Lancet.**, Londres, v. 2, p. 718-725, 1977.
- TUCKER, G. T.; HOUSTON, J. B.; HUANG, S. M. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--toward a consensus. **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v. 52, n.1, p. 1071-1080, 2001.
- UEDA, H. et al. Disappearance rate of tolbutamide in normal subjects and in Diabetes Mellitus, liver cirrhosis, and renal disease. **Diabetes.**, Alexandria, v. 12, p. 414-419, 1963.
- UTPAL, N. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of a combination of metoprolol succinate and telmisartan in Wistar albino rats: Safety profiling. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Nova York, v. 65, n. 2, p. 68-78, 2013.
- VERPLAETSE, R.; CUYPERS, E.; TYTGAT, J. The evaluation of the applicability of a high pH mobile phase in ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in urine and blood. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 1249, p. 147-154, 2012.
- VICTORIA, K. H. B. et al. Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in waste water using liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v. 1269, n. 6, p. 208-217, 2012.
- ZHU, L. Gastric mucosal blood flow and blood viscosity in patients with diabetes. **Zhonghua. Yi. Xue. Za. Zhi.**, Pequim, v. 73, n. 8, p. 476-478, 1993.
- ZINIROLAND, R. et al. Disease-Induced Variations in Plasma Protein Levels. **Clin. Pharmacokinet.**, Nova York, v. 19, n. 3, p. 218-229, 1990.
- WANG, T. et al. Mechanisms and outcomes of drug- and toxicant-induced liver toxicity in diabetes. **Crit. Rev. Toxicol.**, Londres, v. 37, n. 5, p. 413-459, 2007.
- WILD, S. et al. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes. Care.**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.
- WILKINSON, G. R. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: Prediction of in vivo activity in humans. **J. Pharmacokinet. Biopharm.**, Nova York, v. 24, n. 5, p. 475-490, 1996.
- WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. UPLC/MS for the identification of  $\beta$ -blockers. **J. Pharmaceutic. Biomedic. Anal.**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 571-580, 2006.
- YANFENG, W. et al. Effects of imatinib (Glivec) on the pharmacokinetics of metabolism midazolam in a CYP3A drug–drug interaction model rats. **Xenobiotica.**, Londres, v. 35, n. 4, p.305-310, 2005.
- YILMAZ, B.; ASCI, A.; ARSLAN, S. Determination of metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Sep. Sci.**, Weinheim, v. 33, n. 9, p. 1904-1908, 2010.

APÊNDICE A – Parâmetros farmacocinéticos metoprolol e alfa-hidroxi metoprolol.

TABELA I - Parâmetros farmacocinéticos metoprolol, VO em ratos grupo controle (dose=15mg/kg).

ANIMAL	AUC (hr.ng/mL)	Ka (h <sup>-1</sup> )	Kel (h <sup>-1</sup> )	1/2 <sub>β</sub> (h)	CL <sub>r</sub> /F (L/h/kg)	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)
1	293,64	0,07	0,58	3,03	51,08	0,13	142,10
2	212,08	0,07	0,56	2,45	70,72	0,18	149,15
3	371,47	0,11	0,34	2,45	40,37	0,19	296,66
4	537,82	0,15	0,48	4,23	27,89	0,24	294,46
5	284,67	0,04	1,53	2,43	52,69	0,15	92,70
6	390,97	0,08	0,49	4,04	38,36	0,18	214,87

Fonte: Da autora.

TABELA II- Parâmetros farmacocinéticos metoprolol, VO em ratos grupo diabético (dose=15mg/kg).

ANIMAL	AUC (hr.ng/mL)	Ka (h <sup>-1</sup> )	Kel (h <sup>-1</sup> )	1/2 <sub>β</sub> (h)	CL <sub>r</sub> /F (L/h/kg)	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)
1	494,82	0,06	0,63	3,76	30,31	0,16	290,84
2	847,07	0,29	0,07	5,67	17,70	0,19	788,06
3	765,79	0,05	0,65	5,57	19,58	0,14	478,46
4	836,16	0,03	0,17	3,17	17,93	0,07	1398,08
5	1939,53	0,05	0,30	8,74	7,73	0,19	2607,22
6	1105,15	0,17	0,28	2,58	13,57	0,28	996,24

Fonte: Da autora.

TABELA III - Parâmetros farmacocinéticos alfa-hidroxi metoprolol, VO em ratos grupo controle (dose=15,9 mg/kg).

Animal	AUC (hr.ng/mL)	Ka (h <sup>-1</sup> )	Kel (h <sup>-1</sup> )	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)
1	595,51	0,07	1,72	0,35	208,73
2	1739,66	0,11	0,99	0,43	914,89
3	591,99	0,007	1,65	0,14	242,52
4	804,88	0,11	1,55	0,48	291,60
5	4500,22	0,03	3,66	0,26	810,31
6	966,17	0,03	1,48	0,24	412,48

Fonte: Da autora.

TABELA IV - Parâmetros farmacocinéticos alfa-hidroxi metoprolol, VO em ratos grupo diabético (dose=15,9 mg/kg).

Animal	AUC (hr.ng/mL)	Ka (h <sup>-1</sup> )	Kel (h <sup>-1</sup> )	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)
1	800,56	0,20	1,27	0,65	304,99
2	890,21	0,03	1,33	0,26	416,53
3	1247,48	0,07	1,14	0,32	622,92
4	1653,21	0,03	1,03	0,23	989,98
5	1026,09	0,04	1,18	0,26	525,82
6	1458,95	0,02	1,08	0,19	852,89

Fonte: Da autora.

## APÊNDICE B – Parâmetros farmacocinéticos midazolam

TABELA V - Parâmetros farmacocinéticos midazolam, VO em ratos grupo controle (dose= 20 mg/kg).

<b>Animal</b>	<b>AUC (hr.ng/mL)</b>	<b>Ka (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Kel (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>CL<sub>T</sub>/F (L/h/kg)</b>	<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>
1	266,54	0,06	1,23	75,03	0,35	128,01
2	563,77	0,26	0,82	35,47	0,65	277,60
3	332,80	0,31	0,31	60,09	0,45	273,29
4	286,56	0,07	1,16	69,79	0,35	141,70
5	432,41	0,07	1,06	46,25	0,35	228,19
6	533,88	0,09	0,45	37,46	0,31	535,96

Fonte: Da autora.

TABELA VI - Parâmetros farmacocinéticos midazolam, VO em ratos grupo diabético (dose= 20 mg/kg).

<b>Animal</b>	<b>AUC (hr.ng/mL)</b>	<b>Ka (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Kel (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>CL<sub>T</sub>/F (L/h/kg)</b>	<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>
1	1288,02	0,20	0,58	15,52	0,53	872,50
2	1146,18	0,06	0,56	17,44	0,28	1065,42
3	1969,34	0,16	0,60	10,15	0,49	1385,18
4	2204,27	0,10	0,57	9,07	0,62	1827,97
5	1629,68	0,30	0,30	12,27	0,54	1363,87
6	2218,23	0,22	0,35	9,01	0,46	1949,25

Fonte: da autora.

ANEXO A – Parecer favorável ao projeto concedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais - Unifal-MG.

