UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do
lercanidipino em ratos

Marcel Tavares de Farias

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do
lercanidipino em ratos

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Marcel Tavares de Farias

Orientador: Prof. Dr. Jose Salvador Lepera

Marcel Tavares de Farias

Ribeirão Preto
2007

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

Farias, Marcel Tavares de
Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do
lercanidipino em ratos. Ribeirão Preto, 2007.
68 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientador: Lepera, Jose Salvador.

1. Lercanidipino. 2. Etilbenzeno. 3. Enantiômeros. 4. Farmacocinética

Nome do aluno: Marcel Tavares de Farias

Título do trabalho: Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do lercanidipino em ratos.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Jose Salvador Lepera

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais, Alberto e Eusete, pelo amor, carinho e educação;

Aos meus irmãos, Alessandro, Viviane e Luciana;

Aos meus queridos sobrinhos, Hannah, Júlia, Caíque, Matheus e Guilherme;

À minha tia Ana Angélica;

À minha namorada, Lilian, pelo amor e carinho;

Aos meus amigos.

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Prof. Dr. José Salvador Lepera, pela orientação, amizade e apoio.

À colega Juciane Cardoso, pela grande ajuda nas coletas e análise das amostras e pela relação de trabalho e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Toxicologia da FCFRP-USP, Maria Paula e Natalino, pela convivência, paciência e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Toxicologia da FCFAR-UNESP, Elisabete, Maria e Valéria, pelo apoio nas coletas.

Aos colegas de laboratório Adriana, Ana Leonor, Bruno, Carolina, Fernanda, Flávia, Josiane, Natália, Patrícia, Renata, Stefânia, Teresa e Vanessa pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas de turma da pós-graduação, professores e funcionários da FCFRP-USP.

Aos amigos de Ribeirão Preto, pelos momentos de grande alegria convividos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, à todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FARIAS, M. T. **Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do lercanidipino em ratos.** 2007. 68f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O Citocromo P450 (CYP) é responsável pela biotransformação de fármacos, poluentes e outros xenobióticos. O lercanidipino (LER), empregado na clínica como racemato no tratamento da hipertensão arterial, é biotransformado pelo CYP3A4. O etilbenzeno (EBZ), um solvente de ampla utilização industrial, é substrato e indutor do CYP3A em ratos. O estudo visa investigar a influência do EBZ na farmacocinética enantiosseletiva do LER administrado sob forma racêmica a ratos. Foram investigados ratos Wistar tratados com dose única de 3 mg kg^{-1} de LER racêmico administrado por gavagem. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle, expostos ao EBZ 436 mg/m^3 e expostos ao EBZ 876 mg/m^3 . Os animais foram expostos ao EBZ durante 6 horas, em câmara de exposição, do tipo somente pelo nariz, por 5 dias consecutivos. As amostras seriadas de sangue ($n=6$ animais por tempo de coleta) foram coletadas até 6 horas após a administração do LER. Os enantiômeros do LER em plasma de ratos foram analisados em coluna de fase quiral utilizando LC-MS/MS. A farmacocinética do LER é enantiosseletiva em ratos do grupo controle com acúmulo plasmático do distômero (-)-(R)-LER ($\text{AUC}^{0-\infty} = 19,23 \text{ vs } 5,53 \text{ } \mu\text{g min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) e razões enantioméricas de concentrações plasmáticas (-)-(R)/(+)-(S)-LER com mediana de 3,87. O *clearance* aparente ($78,25 \text{ vs } 277,08 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) e o volume de distribuição aparente ($16,63 \text{ vs } 48,95 \text{ L kg}^{-1}$) mostraram-se reduzidos para o distômero (-)-(R)-LER. A disposição cinética do LER para os animais dos grupos EBZ 436 mg/m^3 e 876 mg/m^3 , à semelhança do grupo controle, foi enantiosseletiva com observação de acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER. O acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER, traduzido pelo parâmetro $\text{AUC}^{0-\infty}$, respectivamente para os grupos EBZ 436 mg/m^3 e 876 mg/m^3 ($34,06 \text{ vs } 10,23 \text{ } \mu\text{g min mL}^{-1}$ e $23,79 \text{ vs } 6,97 \text{ } \mu\text{g min mL}^{-1}$) foi decorrente do menor volume de distribuição ($17,02 \text{ vs } 57,79 \text{ L kg}^{-1}$ e $23,11 \text{ vs } 76,05 \text{ L kg}^{-1}$) e do menor *clearance* aparente ($44,87 \text{ vs } 147,60 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ e $65,57 \text{ vs } 258,21 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$). Não foram observadas diferenças nas razões de $\text{AUC}_{(-)/(+)}$ entre os grupos controle (3,87), EBZ 436 mg/m^3 (3,35) e EBZ 876 mg/m^3 (4,26). Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do LER não mostraram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os animais expostos ao EBZ nas concentrações 434 e 868 mg/m^3 .

Palavras-chave: etilbenzeno, lercanidipino, enantiômeros, farmacocinética

ABSTRACT

FARIAS, M. T. **Influence of ethylbenzene on the pharmacokinetic enantioselective of lercanidipine in rats.** 2007. 68f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Cytochrome P450 (CYP) is responsible for biotransformation of drugs, pollutants and other xenobiotics. Lercanidipine (LER), clinically employed as quiral compound in the treatment of arterial hypertension, is biotransformed by CYP3A4. Ethylbenzene (EBZ), a solvent of large industrial use, is substrate and inducer of CYP3A in rats. The present study investigated influence of EBZ in pharmacokinetics of racemic LER 3 mg kg⁻¹ in rats. Animals were divided into 3 groups: control, exposed to EBZ 436 mg/m³ and exposed to EBZ 876 mg/m³. Animals were exposed to EBZ during 6 hours, in a chamber of exposition with nose only exposure system, 5 consecutive days. Serial blood samples (n=6, each time of collection) were collected up to 6 hours after LER administration. LER enantiomers were separated on a quiral phase column and analyzed by LC-MS/MS. LER pharmacokinetics was enantioselective in control rats not treated with EBZ, with plasma accumulation of (-)-(R)-LER diastomer ($AUC^{0-\infty} = 19.23$ vs $5.53 \mu\text{g min}^{-1} \text{mL}^{-1}$) and enantiomeric ratios of (-)-(R)/(+)-(S)-LER of 3.87. Apparent clearance (78.25 vs $277.08 \text{ mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$) and apparent volume of distribution (16.63 vs 48.95 L kg^{-1}) were decreased for (-)-(R)-LER diastomer. Kinetic disposition of LER for animals exposed to EBZ 436 and 876 mg/m³, as for control group, was enantioselective with plasma accumulation of (-)-(R)-LER enantiomer. Plasmatic accumulation of (-)-(R)-LER enantiomer for 436 mg/m³ and 876 EBZ mg/m³ groups (34.06 vs $10.23 \mu\text{g min mL}^{-1}$ and 23.79 vs $6.97 \mu\text{g min mL}^{-1}$, respectively) was consequent of lower volume of distribution (17.02 vs 57.79 L kg^{-1} and 23.11 vs 76.05 L kg^{-1}) and lower apparent clearance (44.87 vs $147.60 \text{ mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$ and 65.57 vs $258.21 \text{ mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$). No differences were observed in $AUC_{(-)/(+)}$ ratios between the control group (3.87), 436 EBZ mg/m³ (3.35) and EBZ 876 mg/m³ (4.26). Pharmacokinetic parameters of LER enantiomers did not show significant differences between animals of control group and exposed animals to EBZ 434 and 868 mg/m³.

Key words: ethylbenzene, lercanidipine, enantiomers, pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do lercanidipino.....	4
Figura 2. Principais metabólitos do lercanidipino em animais e no homem isolados na urina após administração oral.....	7
Figura 3. Biotransformação do etilbenzeno no homem.....	10
Figura 4. Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes.....	15
Figura 5. Esquema do corte transversal do corpo da câmara de exposição a solventes (plano vertical).....	16
Figura 6. Amostragem da atmosfera experimental para análise.....	17
Figura 7. Detalhe de um animal sendo exposto no sistema.....	17
Figura 8. Procedimento de extração líquido-líquido do lercanidipino em plasma.....	24
Figura 9. Cromatograma referente à análise de etilbenzeno em ar na concentração de 1,0 Limite de exposição ocupacional.....	29
Figura 10. Representação da curva de calibração para etilbenzeno no ar nas concentrações de 0,1 a 2 Limite de exposição ocupacional	29
Figura 11. Análise dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de rato. Cromatogramas referentes às amostras de plasma branco (A) e fortificado com padrão interno e lercanidipino (B).....	31
Figura 12. Gráfico de calibração para o enantiômero (+)-(S)-lercanidipino no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,2 a 400 ng mL ⁻¹	32
Figura 13. Gráfico de calibração para o enantiômero (-)-(R)-lercanidipino no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,2 a 400 ng mL ⁻¹	33
Figura 14. Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo para os enantiômeros do lercanidipino do grupo controle (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.....	36

- Figura 15. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do lercanidipino do grupo etilbenzeno 436 mg/m³ (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.....38
- Figura 16. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do lercanidipino do grupo etilbenzeno 876 mg/m³ (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.....40
- Figura 17. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do lercanidipino nos grupos controle, etilbenzeno 436 mg/m³ e etilbenzeno 876 mg/m³. Dados apresentados como média ± erro padrão da média.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de recuperação do etilbenzeno do meio de coleta.....	30
Tabela 2. Coeficientes de variação para cada concentração da curva de calibração e ponderação dos coeficientes.....	30
Tabela 3. Determinação do etilbenzeno na câmara de exposição.....	30
Tabela 4. Efeito da matriz na análise dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de rato. Resultados apresentados como média (n=15)	32
Tabela 5. Recuperação absoluta do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	33
Tabela 6. Limites de quantificação do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	34
Tabela 7. Linearidade para os enantiômeros lercanidipino em plasma.....	34
Tabela 8. Precisão intraensaio para (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	34
Tabela 9. Precisão inter-ensaio para (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	35
Tabela 10. Exatidão intraensaio para (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	35
Tabela 11. Exatidão inter-ensaio para (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma.....	35
Tabela 12. Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no grupo controle. Os ratos foram tratados com 3 mg kg ⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	37
Tabela 13. Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no grupo etilbenzeno 436 mg/m ³ . Os ratos foram tratados com 3 mg kg ⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	39
Tabela 14. Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no grupo etilbenzeno 876 mg/m ³ . Os ratos foram tratados com 3 mg kg ⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	41
Tabela 15. Avaliação da influência do etilbenzeno na farmacocinética dos enantiômeros do lercanidipino.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- (+)-(S)-LER – enantiômero destrógero do lercanidipino
(-)-(R)-LER – enantiômero levógero do lercanidipino
AC – antagonista do canal de cálcio
ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists
 $AUC^{0-\infty}$ - área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo com extrapolação para o infinito
CD – coeficiente de dessorção
 C_{max} – concentração plasmática máxima
CG – cromatografia gasosa
Cl/F – *clearance* total aparente
COV – coeficiente de variação ponderado
CV – coeficiente de variação
CYP – sistema citocromo P450
DHP - diidropiridínico
EBZ – etilbenzeno
HA – hipertensão arterial
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IC – intervalo de confiança
 k_a - constante de velocidade de absorção
 k_{el} – constante de velocidade de eliminação
kg - kilograma
LD – limite de detecção
LEO – limite de exposição ocupacional
LER - lercanidipino
LQ – limite de quantificação
 m_r - massa recuperada pela dessorção
m – massa
m/z – massa/carga
n – número de amostras analisadas
NaOH – hidróxido de sódio

NOES – Nose Only Exposure System
OMS – Organização Mundial da Saúde
PI – padrão interno
PM – peso molecular
 $\mu\text{mol} - 10^{-12} \text{ mol}$
R - recuperação
 R^2 – coeficiente de determinação
STEL – Short Term Exposure Limit
 $t_{1/2a}$ – meia-vida de absorção
 $t_{1/2}$ – meia-vida de eliminação
 t_{max} – tempo para atingir c_{max}
TLV – Threshold Limit Value
TWA – Time Weight Average
Vd/F – volume aparente de distribuição
vs – *versus*

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
 1. INTRODUÇÃO	 1
 2. OBJETIVO	 12
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 14
3.1 Exposição ao etilbenzeno	15
3.2 Análise de etilbenzeno no ar	18
3.2.1 Materiais	18
3.2.2 Equipamentos e acessórios	18
3.2.3 Método	18
3.2.3.1 Preparação de padrões adsorvidos no meio de coleta	18
3.2.3.2 Preparação da amostra para análise	18
3.2.4 Linearidade, exatidão e precisão	19
3.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	20
3.3 Protocolo experimental	21
3.3.1 Grupo controle	21
3.3.2 Grupo exposto ao etilbenzeno	22
3.4 Análise enantiosseletiva do lercanidipino em plasma	22
3.4.1 Reagentes e soluções padrão	22
3.4.2 Equipamentos	22
3.4.3 Extração líquido-líquido	23
3.4.4 Avaliação do efeito da matriz	24
3.4.5 Validação	24
3.4.5.1 Curva de calibração	25

3.4.5.2 Recuperação.....	25
3.4.5.3 Limite de quantificação.....	25
3.4.5.4 Linearidade.....	26
3.4.5.5 Precisão.....	26
3.4.5.6 Exatidão.....	26
3.5 Análise farmacocinética.....	26
3.6 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Análise de etilbenzeno no ar.....	29
4.1.1 Linearidade.....	29
4.1.2 Exatidão.....	29
4.1.3 Precisão.....	30
4.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	30
4.2 Determinação do etilbenzeno na câmara durante os experimentos.....	30
4.3 Análise enantiosseletiva do lercanidipino em plasma.....	31
4.3.1 Separação dos enantiômeros.....	31
4.3.2 Avaliação do efeito da matriz.....	31
4.3.3 Curvas de calibração.....	32
4.3.4 Recuperação.....	33
4.3.5 Limite de quantificação.....	33
4.3.6 Linearidade.....	34
4.3.7 Precisão e exatidão intra e inter ensaios.....	34
4.4 Análise farmacocinética.....	36
4.4.1 Grupo controle.....	36
4.4.2 Grupo etilbenzeno.....	37
4.4.3 Avaliação da influência da exposição ao etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do lercanidipino em ratos tratados com cloridrato de lercanidipino racêmico.....	42
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	51

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICES.....	60
Apêndice A - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, Grupo controle(n=6).....	61
Apêndice B - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo controle(n=6).....	62
Apêndice C - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 436 mg/m ³ (n=6).....	63
Apêndice D - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 436 mg/m ³ (n=6).....	64
Apêndice E - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 876 mg/m ³ (n=6).....	65
Apêndice F - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 876 mg/m ³ (n=6).....	66
ANEXO.....	67
Anexo A - Protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.....	68

1 INTRODUÇÃO

A disposição cinética e o metabolismo têm se mostrado como dois parâmetros de grande importância no processo de desenvolvimento de fármacos. Aproximadamente 30 a 40% dos novos fármacos em desenvolvimento são excluídos ainda nas fases de estudos clínicos por possuírem propriedades farmacocinéticas desfavoráveis (INGELMAN-SUNDERBERG, 2001).

Atualmente 60% dos fármacos empregados na clínica são opticamente ativos e a maioria dos compostos sintéticos quirais são administrados como racematos. Os enantiômeros individuais de um racemato, caracterizados por diferentes orientações espaciais, geralmente manifestam diferentes efeitos farmacológicos e toxicológicos em razão do processo de ligação dos fármacos com seus respectivos receptores (ZHOU; YAO; ZENG, 2002). Em outras palavras, a utilização clínica de um fármaco racêmico constitui para a terapêutica uma combinação fixa de fármacos com diferentes propriedades farmacológicas e diferentes potenciais de manifestação de toxicidade (BROCKS, 2006). A farmacocinética também pode discriminar entre os enantiômeros em um ou mais dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. O metabolismo é o processo que apresenta o maior grau de enantiosseletividade na disposição de fármacos quirais (KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; ZHOU; YAO; ZENG, 2002).

Os avanços nos estudos de biotransformação de fármacos quirais têm permitido a identificação das principais enzimas de fase I e fase II responsáveis pelas conversões metabólicas. No entanto, a grande variabilidade interindividual no metabolismo humano desses fármacos permanece como um obstáculo constante. Essas variações podem levar a resultados indesejáveis e, freqüentemente, difíceis de prever, incluindo a ausência do efeito terapêutico esperado e manifestação de efeitos adversos em populações específicas. Entre as causas para essas variações no metabolismo de fármacos, o polimorfismo genético, estados fisiológicos e patológicos, assim como a interação entre fármacos administrados concomitantemente são reconhecidas como preponderantes (KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; ZHOU; YAO; ZENG, 2002). Por outro lado, a influência dos fatores ambientais em geral, e da exposição ocupacional em particular, praticamente ainda não foram investigadas.

Dos fatores relacionados ao metabolismo, a indução e a inibição enzimática podem afetar os enantiômeros de um fármaco quiral em diferentes extensões, sendo essas alterações mais expressivas quando os enantiômeros sofrem

biotransformação através de diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades (HUTZLER; TRACY, 2002; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; KARIN, 1996; KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996; MEHVAR; REYNOLDS, 1996).

A biotransformação desempenha um papel importante na modulação da toxicidade das substâncias. Dentre as enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos e drogas, poluentes e outros xenobióticos, a principal em termos de versatilidade catalítica é o citocromo P450 (CYP) (PARKINSON, 2001).

O CYP é uma hemoproteína que possui várias isoformas distintas que estão presentes em altas concentrações no fígado, embora sejam encontradas em diferentes tecidos (NAKAJIMA; AOYAMA, 2000). A principal função do CYP é geralmente converter moléculas lipofílicas em compostos mais polares, que podem ser mais facilmente eliminados do organismo (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999).

Recentemente, os conhecimentos a respeito das bases moleculares para a indução ou inibição do CYP têm obtido grandes progressos. Uma avaliação dos mecanismos de conversão metabólica de 315 diferentes fármacos revelou que 56% deles são biotransformados primariamente pelo CYP3A4, seguido pelo CYP2D6 (20%), CYP2C9/19 (15%), CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2 e outros não identificados. Todas essas isoformas podem ser induzidas, exceto o CYP2D6, ou inibidas por diferentes substâncias alterando o metabolismo de um fármaco quiral em diferentes extensões (HUTZLER; TRACY, 2002; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999; KROEMER; FROMM; EINCHELBAUM, 1996).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência da hipertensão arterial (HA) é bastante elevada e, em alguns países, pode acometer de 15 a 25% da população adulta. Dessa maneira, a hipertensão provoca um impacto relevante na qualidade de vida da população (WILLIAMS et al., 2004).

Os fármacos mais comumente empregados no tratamento da hipertensão arterial são: diuréticos, β -bloqueadores, antagonistas dos canais de cálcio (AC), inibidores da enzima conversora da angiotensina e α -bloqueadores. Dentre estas classes, os AC constituem uma importante opção terapêutica, por serem eficazes em todos os estágios da HA: leve/moderada, grave, complicada por lesões em órgãos-alvo e nos casos em que está associada a outras doenças (CAFIERO; GIASI, 1997).

Dentro do grupo dos antagonistas de canais de cálcio diidropiridínicos (AC-DHP), existem diferenças moleculares significativas, relacionadas principalmente à farmacocinética, à seletividade vascular, à ação sobre a contratilidade miocárdica e à incidência de efeitos colaterais. A importância destas diferenças justifica a recente classificação dos AC-DHP em primeira (nifedipino), segunda (amlodipino) e terceira (lercanidipino, lacidipino, manodipino e pranidipino) geração molecular (LAAKSO; LEHTO, 1998; CAFIERO; GIASI, 1997). De acordo com seus efeitos clínicos, o lercanidipino (LER) é considerado o fármaco DHP de terceira geração de maior representatividade (TOYO-OKA; NAYLER, 1996; VAN ZWIETEN; MANCIA, 1996; JULIUS, 1993).

O LER é um antagonista dos canais de cálcio tipo L pertencente ao grupo das 1,4-diidropiridinas, recente e direcionalmente desenvolvida com o propósito de prolongar a ação e, portanto, de maior adequação para o tratamento de primeira linha na hipertensão arterial (McCLELLAN; JARVIS, 2000).

Do ponto de vista químico, o LER é o ($\pm$) cloridrato de ácido piridinedicarboxílico, 1,4-diidro-2,6-dimetil-4-(3-nitropenil)-2-[(3,3-difenilpropil) metilamina]-11-dimetil etil metil éster (PM=648,2, pKa = 6,83). A presença da porção bifenila confere ao LER uma estrutura única, parte com característica de hidrossolubilidade e parte caracterizada por lipossolubilidade (HERBETTE et al., 1998).

A molécula do LER apresenta um centro quiral na posição 4 do anel DHP, disponível na clínica como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R), os quais contribuem de forma diferente para a sua atividade farmacológica (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura molecular do lercanidipino. (*) denota centro quiral (JABOR et. al., 2003).

A atividade anti-hipertensiva reside essencialmente no enantiômero (+)-(S)-LER (HERBETTE et al., 1998; CERBAI et al., 2000; CARGNONI et al., 1997). LEONARDI et al. (1997) mostraram em um estudo “in vitro” que o enantiômero (+)-(S)-LER apresenta cerca de 100-200 vezes mais afinidade pelos canais de cálcio tipo L que o enantiômero (-)-(R)-LER. Consequentemente, os efeitos farmacodinâmicos do LER são manifestados principalmente pelo enantiômero (+)-(S).

A conformação molecular do LER é dotada de alta especificidade e seletividade para células da musculatura lisa vascular. Sua acentuada lipossolubilidade permite o acúmulo na dupla camada lipídica da membrana celular. Destes depósitos, o LER é lento e continuamente liberado para alcançar os canais de cálcio tipo L, o que caracteriza sua ação prolongada. Suas moléculas se ligam aos receptores dos canais de cálcio, provocando o relaxamento das fibras musculares lisas e dilatação dos vasos sanguíneos, resultando nas reduções da resistência vascular periférica e da pressão arterial. O lento início de atividade vasodilatadora explica porque não ocorrem a ativação simpática e a taquicardia reflexa características dos AC lipofílicos. A estrutura química peculiar do LER pode ser a responsável pelo controle e modulação da membrana, uma vez que a maioria dos AC apresenta uma estrutura mais compacta e menos lipofílica (HERBETTE et al., 1998).

Vários estudos das propriedades farmacodinâmicas, “in vitro” e “in vivo”, com animais (CERBAI et al., 2000; SABBATINI; TOMASSONI; AMENTA, 2001; CORSINI et al., 1996; GUARNERI et al., 1996; SIRONI et al., 1996.) e humanos (McCLELLAN; JARVIS, 2000; MANCIA; OMBONI; ZANCHETTI, 1998; COMINACINI et al., 1999; AMBROSINI; CIRCO, 1997; ACANFORA et al., 2000; DE GIORGIO et al., 1999), têm sido realizados com o LER, comprovando sua eficácia como agente hipotensor e sua possível interferência nos eventos da aterogênese (BORASO et al., 1997).

Estudos em humanos demonstram que a principal vantagem clínica do LER é sua eficácia na redução da pressão arterial sistólica e diastólica durante um período de 24 horas, com efeito hipotensor alcançado entre 5-7 horas depois da primeira administração (MANCIA; OMBONI; ZANCHETTI, 1998; AMBROSINI; CIRCO, 1997; ACANFORA et al., 2000; DE GIORGIO et al., 1999).

A farmacocinética do LER foi investigada previamente em animais (FARINA et al., 1997) e posteriormente em humanos (BARCHIELLI et al., 1997), usando-se o

LER radiomarcado (Carbono ¹⁴) na posição C-6 do anel DHP, posição não sujeita à biotransformação, em analogia às outras DHPs.

A dose diária usual do LER sob a forma racêmica para o tratamento da HA é de 10 a 20 mg. O efeito do LER sobre a pressão sanguínea é gradual, mantendo-a estável durante 24 horas (McCLELLAN; JARVIS, 2000).

A absorção do LER no homem é rápida e quase completa após a administração oral. A presença de alimentos favorece a absorção do LER, por isso recomenda-se que sua administração seja feita antes das refeições. A meia-vida de eliminação é curta, variando de 2 a 5 horas (BORASO et al., 1997). As concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) do enantiômero (+)-(S)-LER são atingidas em aproximadamente 2 a 3 horas após a administração oral de 10 ou 20 mg de LER em pacientes com hipertensão leve a moderada (McCLELLAN; JARVIS, 2000).

O perfil de distribuição tecidual do LER é típico de uma substância altamente lipofílica (BARCIELLI et al., 1997). O LER é acumulado na bicamada lipídica das membranas celulares da parede arterial devido à presença do grupamento bifênica na cadeia lateral. O volume de distribuição é de 2-2,5 L kg⁻¹ em voluntários sadios e a ligação às proteínas plasmáticas é consideravelmente alta, superior a 98% (BARCIELLI et al., 1997).

Após administração oral, o LER sofre extenso metabolismo de primeira passagem dependente do CYP3A4, originando vários metabólitos inativos e reduzindo sua biodisponibilidade sistêmica (McCLELLAN; JARVIS, 2000; BARCIELLI et al., 1997). Estudos de administração de LER em dose única oral de 10, 20 e 40 mg mostraram que os níveis plasmáticos e a área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (AUC) não foram linearmente correlacionados com a dose administrada, sugerindo saturação no metabolismo de primeira passagem.

O LER é eliminado essencialmente após biotransformação. Aproximadamente 50% de uma dose oral de [¹⁴C] LER foi eliminada nas fezes e 44% na urina (principalmente na forma de metabólitos) (McCLELLAN; JARVIS, 2000). Foram isolados vários metabólitos da urina (Figura 2), empregando a técnica de cromatografia em camada delgada, baseando-se nas migrações comparativas das bandas radioativas. O principal metabólito origina-se da desaminação oxidativa da cadeia lateral e da aromatização do anel DHP. Outras vias metabólicas envolvem o

processo de conjugação com o ácido glicurônico, N,N-didesalquilação e redução do grupo nitro (NO_2). O *clearance* total aparente (Cl/F) do enantiômero (+)-(S), seguindo administração do LER racêmico a voluntários sadios, é de $12,6 \text{ L h}^{-1}$ (BARCIELLI et al., 1997).

Figura 2 – Principais metabólitos do LER em animais e no homem isolados na urina após administração oral (TESTA et. al., 1997).

A farmacocinética do LER como mistura enantiomérica foi avaliada em ratos empregando o fármaco marcado com ^{14}C , na dose de 3 mg kg^{-1} . A biodisponibilidade do LER é baixa, com valores da ordem de 17%. A concentração plasmática máxima é de aproximadamente 200 ng mL^{-1} e o tempo para atingir a concentração plasmática máxima é de 0,5 hora. A meia-vida de eliminação em ratos é em média de 1,5 horas (FARINA et al., 1997; TESTA et al., 1997).

A presença de agentes químicos no cotidiano humano é praticamente ubíqua, posto que eles têm sido empregados amplamente em muitas atividades agrícolas, industriais, comerciais e domésticas. Atualmente estão em uso industrial cerca de 80.000 substâncias e estima-se que 2.000 são introduzidas a cada ano, para uso inclusive em produtos como alimentos, produtos de cuidado pessoal, medicamentos

e produtos de limpeza e jardinagem.

Milhões de pessoas expõem-se cotidianamente a agentes químicos no ambiente de trabalho, tornando imprescindível a vigilância do risco à saúde. O controle do risco destas exposições é feito com base nos Limites de Exposição Ocupacional (LEO), que são guias ou padrões para manter o risco da exposição em níveis que possam ser considerados aceitáveis. Os LEO são propostos por agências governamentais ou por organizações internacionais, entre as quais é referência mundial a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), associação de higienistas de todo o mundo, com sede nos Estados Unidos, que é proponente dos TLVs - *Threshold Limit Values*, sua marca registrada (ACGIH, 2006).

Mais que a concentração limite para exposição a uma dada substância, os LEO pretendem especificar as condições em que tais concentrações são capazes de proteger a saúde dos trabalhadores ocupacionalmente expostos. Geralmente, referem-se a uma jornada de trabalho de 8 horas/dia e quarenta horas semanais, repetidas ao longo da vida laboral, e visam proteção aos chamados efeitos críticos, referência aos primeiros efeitos adversos observáveis em caso de exposição excessiva. Posto que as concentrações flutuam ao longo da jornada de trabalho e que é necessária certa distinção entre efeitos críticos, do ponto de vista de sua repercussão sobre o indivíduo, são propostas categorias de LEO (RAPPAPORT, 2005).

Assim, a ACGIH propõe um limite para a média ponderada pelo tempo das concentrações (TLV-TWA - *Time Weighted Average*) para balizar a exposição média de uma jornada de trabalho de 8 horas. Dado que o limite é para a média ponderada da concentração, fica implícita a aceitação de variações da concentração a valores superiores ao valor limite, fato que é controlado pelos limites para exposição de curta duração (TLV STEL - *Short Term Exposure Limit*), valores que podem repetir-se até quatro vezes durante a jornada, com máximo de 15 minutos de duração e a intervalos mínimos de 1 hora, e mantida a média ponderada da jornada abaixo do TLV-TWA. Finalmente, para as substâncias cujo efeito crítico é de importância expressiva e imediata, são propostos os limites teto (TLV *ceiling*), os quais não devem ser atingidos em nenhum momento da jornada de trabalho (ACGIH, 2006).

Embora existam poucos estudos na literatura, recentemente tem aumentado a atenção aos efeitos dos solventes orgânicos na atividade do CYP em razão da importância dessas enzimas no metabolismo de medicamentos (BUSBY;

ACKERMANN; CRESPI, 1999;).

O etilbenzeno é um solvente aromático de ocorrência natural no petróleo. É empregado como solvente, e na indústria do plástico e da borracha e é matéria prima para a produção do estireno. Usualmente ele está presente em misturas complexas como os tóneres e a gasolina automotiva e de aviação, mas pode ser parcela importante de solventes com pureza adequada ao uso industrial como o xileno, por exemplo, que contém cerca de 20% de etilbenzeno. É um solvente utilizado em grande volume, estimando-se que supere os 3,7 milhões de toneladas anuais, dos quais 90% são destinados à produção de estireno e, o restante, ao uso como solvente e para produção de outras moléculas orgânicas como o divinilbenzeno, acetofenona e acetato de celulose (ACGIH, 2006; HENDERSON, 2005). Portanto, há grande diversidade de oportunidades de exposição ocupacional ao etilbenzeno.

O etilbenzeno é absorvido principalmente através das vias respiratória e dérmica. Por possuir características de rápida volatilização, a via respiratória é a mais importante no ambiente ocupacional, sendo sua retenção de 56 a 64% (ACGIH, 2006). A principal via de biotransformação é através do metabolismo enzimático e a fração eliminada inalterada pelo ar exalado é quantitativamente insignificante. É extensivamente biotransformado por oxidação da cadeia lateral, tendo por principais produtos os ácidos mandélico e fenilglioílico, que são excretados na urina e correspondem, respectivamente, a cerca de 64% e 25% da dose absorvida, conforme ilustrado na Figura 3. Humanos e animais expostos ao etilbenzeno exibem ainda os ácidos hipúrico, fenacetúrico, traços de etilfenóis e de hidroxiacetofenonas como metabólitos secundários. O ácido mandélico e o etilbenzeno no ar exalado podem ser usados como indicadores biológicos da exposição ocupacional ao etilbenzeno (ACGIH, 2006; HENDERSON, 2005).

Figura 3 - Biotransformação do etilbenzeno no homem (ACGIH, 2006).

Sams et al. (2004) observaram que em microssomas hepáticos humanos, a primeira etapa da biotransformação do etilbenzeno, que é a conversão a feniletanol, é mediada pelos CYP 1A2, 2B6, 2C19, 2D6, 2E1, 2C9 e 3A4, sendo mais ativas as isoformas 1A2 e 2B6, respectivamente com 43 e 48 pmoles de etilbenzeno biotransformados por minuto e por pmol de proteína.

Serron, Dwvedi e Backes (2000) reportam que ratos tratados com dose única de etilbenzeno (10 mmol kg^{-1} , via intraperitoneal) mostraram aumento nos níveis das proteínas correspondentes ao CYP3A2 de 67%, ao CYP2E1, de 80% e ao CYP2B de 20 vezes.

Yuan et al. (1994, 1997) também relatam indução dos CYP 2B1, 2B2, 2C11, 2E1, 3A e 3A2 após uma injeção diária intraperitoneal de 10 mmol kg^{-1} de etilbenzeno em ratos, por 1 a 3 dias, e observaram que a modulação ocorre de forma diferente para as diferentes isoformas, quanto à intensidade, ao tempo, e aos níveis de mRNA.

O etilbenzeno possui baixa toxicidade aguda e crônica para animais e humanos, com DL_{50} oral para ratos estimada em $3,5$ a $4,7 \text{ g kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Por via inalatória, a CL_{50} é estimada em $19,7 \text{ g/m}^3$ (exposição durante 4 horas) e o NOAEL – *Non Observed Adverse Effect Level* é estimado em $1,07 \text{ g/m}^3$ (exposição durante 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 13 semanas) (HENDERSON, 2005).

O etilbenzeno, em humanos, manifesta as ações irritante neurossensorial e depressora do Sistema Nervoso Central. Os limites de exposição ocupacional

propostos, de 100 ppm (434 mg/m³) para a média ponderada pelo tempo (TLV-TWA®) e de 125 ppm (543 mg/m³) para exposições de curta duração (TLV-STEL®), visam minimizar o potencial de risco para tais manifestações (ACGIH, 2006).

Embora estejam descritos na literatura vários estudos sobre os efeitos do etilbenzeno na saúde do trabalhador e em animais de experimentação, pouco se sabe sobre os seus efeitos na atividade do CYP e, conseqüentemente, na biotransformação de medicamentos quirais dependente desse sistema enzimático. Considerando que o metabolismo do LER é dependente do CYP3A4 e que o etilbenzeno é um efetivo indutor do CYP3A em ratos (SERRON; DWVEDI; BACKES, 2000; YUAN et al., 1994, 1997), o estudo visa investigar, em ratos, a influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do LER administrado sob a forma racêmica.

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi investigar a influência do etilbenzeno na farmacocinética dos enantiômeros do lercanidipino em ratos expostos ao solvente, por inalação, em câmara de exposição.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Exposição ao etilbenzeno

No presente estudo, utilizou-se câmara de exposição do tipo apenas pelo nariz (nose only exposure system, NOES), construída na Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto-USP. A câmara de exposição é dotada de onze portas, dispostas radialmente no mesmo plano. Assim, é possível expor até dez animais simultaneamente, considerando a reserva de uma das portas para amostragens da atmosfera experimental e verificação de sua concentração. Esquemáticamente, o sistema é constituído dos elementos representados na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes.

O suprimento de ar foi propiciado por um compressor livre de óleo, umidificado por borbulhamento, a somatória das vazões de arraste e de diluição foram controladas por orifícios críticos e individualmente ajustadas através de fluxômetros dotados de rotâmetros individuais. A geração do vapor foi feita por injeção contínua do solvente diretamente em fluxo de ar, seguindo-se a adução de fluxo de diluição e introdução do fluxo resultante em sentido ascendente na câmara de exposição. A Figura 5 mostra um desenho esquemático da câmara de exposição.

Figura 5 - Esquema do corte transversal do corpo da câmara de exposição a solventes (plano vertical). (1) cone para conexão do dispositivo de contenção do animal (2) tubo para levar os vapores à zona respiratória do animal, (3) tirante de fixação da tampa da câmara externa, (4) base do conjunto, (5) câmara externa – exaustão, (6) tampa da câmara interna, (7) câmara interna – alimentação dos vapores, (8) exaustão, (9) entrada do vapor.

A amostragem da atmosfera foi realizada durante o período experimental para permitir a estimativa da exposição total ao etilbenzeno, com os meios de coleta posicionados de maneira similar à do nariz dos animais.

Na Figura 6 pode ser observado o posicionamento do tubo de coleta na porta da câmara de exposição e, na Figura 7, o detalhe de um animal sendo exposto.

Figura 6 - Amostragem da atmosfera experimental para análise.

Figura 7 - Detalhe de um animal sendo exposto no sistema.

3.2 Análise de etilbenzeno no ar

3.2.1 Materiais

O etilbenzeno e o isopropilbenzeno (cumeno) grau P.A. foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o dissulfeto de carbono foi obtido da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Os gases utilizados na cromatografia em fase gasosa (nitrogênio, hidrogênio e ar sintético) foram obtidos da Air Liquide SA.

Os tubos de carvão ativo 100/50mg foram obtidos da SKC® Inc (Eighty Four, PA, USA, ref. 226-01, lote 2000).

3.2.2 Equipamentos e acessórios

O cromatógrafo a gás modelo CG 500 A, da Instrumentos Científicos CG Ltda, foi equipado com injetor capilar tipo split/splitless, detector de ionização de chama, integrador eletrônico (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA; HP3396 II) e coluna capilar de sílica fundida Supelcowax 10 (Polietilenoglicol) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) com as seguintes dimensões: 30m x 0,25mm x 0,25µm.

As bombas de amostragem microprocessadas modelo Pocket Pump (SKC, Eighty Four, PA, USA) foram previamente calibradas para a vazão de 100 mL/min.

3.2.3 Método

3.2.3.1 Preparação de padrões adsorvidos no meio de coleta

Para a preparação de padrões adsorvidos foram construídos tubos evaporadores, no próprio laboratório, empregando-se aproximadamente 150 mg de lã de vidro silanizada e dessecada a 100° C por 12 horas, para cada tubo de vidro de 5 cm de comprimento por 7 mm de diâmetro. Cada tubo evaporador foi conectado à entrada de um tubo de coleta, e este conectado a uma bomba de amostragem calibrada a 100 mL min⁻¹. Mantendo-se o conjunto na vertical, com fluxo ascendente, injetou-se a massa desejada de solvente na lã de vidro do tubo evaporador, fazendo-se passar pelo conjunto cerca de 6 litros de ar. (LEPERA; COLACIOPPO, 2002).

3.2.3.2 Preparação da amostra para análise

Os tubos coletores foram abertos, transferindo-se a seção frontal do meio de coleta (100 mg) para frascos de 3,5 mL, com tampas de rosca e septo protegido por teflon. A cada frasco foi adicionado 1 mL de dissulfeto de carbono contendo

isopropilbenzeno como padrão interno na concentração de $2\mu\text{L mL}^{-1}$. Os frascos foram ocasionalmente agitados por um período de trinta minutos para o procedimento de dessorção (NIOSH, 2003).

A curva de calibração foi construída (em triplicata) nas concentrações de 43,4; 217; 434 e 868 mg/m^3 , correspondentes respectivamente a 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 vezes o LEO, através da diluição de volumes apropriados de etilbenzeno diretamente na solução de dessorção contendo o padrão interno.

As análises foram executadas em cromatógrafo a gás, com detector de ionização de chama. Foi injetado 1 μL de amostra, nas seguintes condições cromatográficas:

- Gás de arraste: Hidrogênio, na vazão de 1 mL min^{-1}
- Temperatura do injetor: 180°C
- Temperatura do detector: 220°C
- Temperatura do forno: 100°C (modo de operação isotérmica)
- divisão de amostra na razão de 1:70

3.2.4 Linearidade, exatidão e precisão

Prepararam-se cinco replicatas de cada concentração de etilbenzeno no ar, correspondentes a 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 vezes o limite de exposição ocupacional de 100 ppm ou 434 mg/m^3 , para a média ponderada pelo tempo (TLV-TWA - ACGIH, 2006). Cada replicata foi preparada com a massa de etilbenzeno correspondente à coleta de ar por 1 hora, na vazão de 100 mL por minuto para cada concentração, ou seja, 0,2604; 1,302; 2,604 e 5,208 mg respectivamente (NIOSH, 2003).

As replicatas foram preparadas injetando-se com microseringa, volumes apropriados de etilbenzeno, nos tubos evaporadores, conforme descrito em 3.2.3.1. Após a adsorção, os tubos coletores foram fechados com tampas apropriadas e mantidos em geladeira a 4°C por 24 horas antes da análise.

O teste de linearidade utiliza os desvios entre replicatas para prever o afastamento da média dos valores de y em relação à linha que melhor se ajusta, considerando a relação entre x e y como linear. Se o afastamento excede em muito o previsto, o teste produz um pequeno valor de P, sugerindo ser incorreto assumir a linearidade (também chamado de teste F para a falta de ajuste).

A exatidão pode ser expressa pelo coeficiente de dessorção (CD), que é a percentagem média de recuperação do solvente coletado, em cada concentração, conforme indicado na equação abaixo:

$$CD(\%) = m_r \times 100 / m$$

onde m_r é a massa recuperada pela dessorção e m é a massa introduzida no tubo de adsorção.

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação ponderado para as concentrações dessorvidas, de acordo com a seguinte equação:

$$\overline{COV} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n f_i (COV_i)^2}{\sum_{i=1}^n f_i} \right]^{1/2}$$

onde: COV é o coeficiente de variação ponderado, i é o índice para os n níveis de concentração, COV_i é o coeficiente de variação das replicatas da concentração i e f é o número de graus de liberdade (número de replicatas menos 1 no nível de concentração i).

3.2.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A determinação do LD e LQ foi feita segundo o Procedimento Operacional Padrão nº 18 (NIOSH, 1995). Assim, as concentrações 4,34; 8,68; 17,36; 34,72; 43,4 e 86,8 mg/m³ de etilbenzeno, correspondentes a 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1 e 0,2 vezes o LEO para o etilbenzeno, foram preparadas por diluição em dissulfeto de carbono, de modo a se injetar volumes constantes de 5 µL da solução, no tubo evaporador, conforme descrito em 3.2.3.1. Após adsorção, os tubos coletores foram fechados com tampas apropriadas e mantidos em geladeira a 4° C por 24 horas antes da análise.

Obtida a equação de regressão linear para a calibração acima, $y = mX + b$, calculou-se os valores preditos de y para cada massa (y_p). Calculou-se também o erro padrão da regressão s_y dado por:

$$s_y = \left[\sum (y_p - y)^2 / n - 2 \right]^{1/2}$$

O LD é definido como $3S_y/m$ e corresponde à massa do analito que produz um sinal acima da média do sinal do branco, em 3 vezes o desvio padrão do branco. O LQ é definido como massa maior que aquela que produz o sinal igual àquele do branco + dez vezes o seu desvio padrão; isto é, $\pm 30\%$ de incerteza.

3.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP Protocolo-CEP/FCF/CAr nº 15/2006 (Anexo A).

Foram utilizados ratos machos, Wistar, de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista. Antes dos experimentos, os animais permaneceram durante 3 dias no Biotério da Disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP para adaptação, com livre acesso a ração e água. Os animais foram divididos em três grupos, sendo um controle e dois grupos expostos ao etilbenzeno.

3.3.1 Grupo controle

Os animais foram expostos ao ar ambiente na câmara de exposição, 6 horas por dia, durante 4 dias. No quinto dia, em estado de jejum de 12 horas, os animais receberam, por via oral (gavagem), cloridrato de lercanidipino racêmico na dose de 3 mg kg^{-1} (TESTA et al., 1997), dissolvido em polietilenoglicol 400 : água na proporção de 60:40 (v/v). Os animais foram mantidos na câmara de exposição durante as coletas das amostras de sangue, através da excisão de cerca de 0,3mm da porção distal da cauda, após vasodilatação por aquecimento localizado a 42°C . As coletas foram feitas nos tempos zero, 10, 20, 30 e 45 minutos e 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 horas após a administração do lercanidipino. A heparina (Liquemine® Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil) foi utilizada como anticoagulante. De cada animal, foram coletadas três amostras em diferentes tempos ($n=6$ replicatas para cada tempo). Após a última coleta, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono. Os plasmas obtidos, após centrifugação das amostras, foram armazenados a -20°C e sob a proteção da luz até a análise do LER.

3.3.2 Grupo exposto ao etilbenzeno

Os animais foram expostos a 434 ou 868 mg/m³ de etilbenzeno, equivalentes a 1 e 2 vezes o LEO para o etilbenzeno, 6 horas por dia, durante 4 dias. No quinto dia, em estado de jejum de 12 horas, os animais receberam, por via oral, cloridrato de lercanidipino racêmico na dose de 3 mg kg⁻¹, dissolvido em polietilenoglicol 400 : água na proporção de 60:40 (v/v). Os animais foram mantidos na câmara de exposição durante as coletas das amostras de sangue. As coletas foram feitas de maneira similar ao grupo controle e os plasmas obtidos, após centrifugação das amostras, foram armazenados a -20° C e sob a proteção da luz até a análise do LER.

3.4 Análise enantiosseletiva do lercanidipino em plasma

3.4.1 Reagentes e soluções padrão.

Foram utilizados os solventes grau HPLC hexano (EM Science[®], Gibbstown) e etanol (Merck[®], Darmstadt, Alemanha). Foram ainda utilizados dietilamina (p.a., Mallinckrodt OR[®], Paris), etanol e álcool isopropílico (p.a., Merck[®], Darmstadt, Alemanha).

A solução aquosa de NaOH (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) foi preparada na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e a solução aquosa de acetato de amônio (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) foi preparada na concentração de 10 mmol L⁻¹. Toda água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q[®] (Waters).

O cloridrato de lercanidipino racêmico, gentilmente cedido pela Recordati Industria Chimia e Farmaceutica S.p.A. (Milan, Itália), foi preparado na concentração de 1mg de Lercanidipino por mL de metanol e posteriormente diluído para a obtenção de concentrações de 0,008; 0,016; 0,04; 0,16; 1; 2; 5; e 16 µg de cada enantiômero/mL de metanol. A amiodarona foi empregada como padrão interno e diluída em metanol na concentração de 50 µg/mL de metanol. Todas as soluções padrão foram protegidas da luz e armazenadas a -20°C.

3.4.2 Equipamentos

O sistema HPLC foi constituído por cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto por bomba modelo LC-10 AS e um detector por espectrometria de massas

Micromass[®] (Micromass, Manchester, UK) modelo Quatro Micro[®] operando com energia capilar, energia de cone, energia de extrator, temperatura da fonte e temperatura de dessolvatação em, respectivamente, 3,0 kV, 40 V, 4,0 V, 100 °C e 150 °C. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador a 365 L h⁻¹. O argônio foi usado como gás de colisão a uma pressão aproximada de 3,5 x 10⁻³ mbar. Para registrar e integrar os picos foi empregado o *software* MassLynx[®] (Micromass, Manchester, UK), versão 3,5.

A separação cromatográfica foi obtida em coluna Chiralpak[®] AD 250mm x 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 10µm (Chiral Technologies Inc., Exton, PA, USA), com pré-coluna Lichrospher[®] 100 RP-18 (4mm x 4mm i.d.) com partículas de 5µm (Merck, Darmstadt, Alemanha). A coluna foi mantida na temperatura de 30 (±1) °C durante toda a análise. A fase móvel, que eluiu pelo sistema na vazão de 1,3 mL/min, foi constituída por hexano:etanol:dietilamina 95:5:0,1(v/v/v) e infusão pós-coluna de solução composta de etanol:acetato de amônio 10 mmol L⁻¹ (95:5, v/v). Foi empregado o interfaceamento por electrospray. O modo de ionização das moléculas foi positivo com o equipamento operando em modo de monitorização seletiva de íons. Desta forma foram analisadas as seguintes transições massa/carga (m/z): 612,40 > 100,10 para os enantiômeros do LER e 646,30 > 100,30 para a amiodarona.

3.4.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi realizada utilizando-se 0,5 mL de plasma enriquecido com 25 µL de cada solução padrão e 25 µL de padrão interno. Adicionaram-se 50 µL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e 4,5 mL de hexano:isopropanol na proporção de 99:1 (v/v). Após 2 minutos de agitação em agitador do tipo *mixer* e centrifugação por 10 min (2000 rpm), o solvente recuperado em volume definido (4 mL) foi concentrado até a secura em tubos cônicos e o resíduo obtido retomado em 100 µL de fase móvel, dos quais 50 µL foram submetidos à análise cromatográfica (Figura 8).

Figura 8 - Procedimento de extração líquido-líquido do lercanidipino em plasma

3.4.4 Avaliação do efeito da matriz

O efeito da matriz (plasma de rato) na ionização do padrão interno e dos enantiômeros do LER foi avaliado com base na comparação entre as alturas dos picos obtidas na injeção direta dos padrões na fase móvel e as alturas obtidas após o enriquecimento de extratos de plasma branco de rato com as referidas soluções padrão. Foram analisadas, em triplicata, as soluções padrão de lercanidipino nas concentrações de 0,4; 50 e 100 ng de cada enantiômero por mL de plasma. Ressalta-se que foram experimentadas alíquotas de plasma obtidas de cinco diferentes animais. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4.5 Validação

O método foi validado com base nos parâmetros analíticos linearidade, recuperação, precisão e exatidão intra e inter-ensaios e limite de quantificação de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

3.4.5.1 Curva de Calibração

Amostras de plasma branco (0,5 mL) fortificadas com 25 µL de cada uma das soluções padrão descritas no item 3.4.1 foram submetidas ao procedimento de extração e posteriormente à análise cromatográfica. As razões de áreas, padrão/PI, foram plotadas em função das concentrações para o cálculo das equações de regressão linear e dos coeficientes de determinação (0,2 – 400 ng de cada enantiômero do lercanidipino por mL de plasma).

3.4.5.2 Recuperação

A recuperação (R) é o valor, expresso em porcentagem, da relação entre a área obtida da análise cromatográfica de amostras submetidas ao procedimento de extração e a área obtida da análise cromatográfica de soluções padrão não extraídas, representada pela seguinte equação:

$$R = \frac{\text{área da amostra extraída/área PI}}{\text{área do padrão não extraído/área PI}} \times 100$$

Amostras de plasma fortificadas com soluções padrão de LER (0,4; 125 e 250 ng de cada enantiômero por mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.4.3 e posteriormente adicionadas de PI. As áreas obtidas na análise cromatográfica foram comparadas com as áreas obtidas das soluções padrão de LER não submetidas ao procedimento de extração, empregando-se a equação descrita acima.

3.4.5.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração do fármaco que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, ou seja, coeficientes de variação e inexatidão de até 20%, nas condições estabelecidas.

Para se determinar o limite de quantificação, foram construídas curvas de calibração para cada analito como descrito no item 3.4.5.1, incluindo-se a concentração plasmática de 0,2 ng de cada enantiômero de LER/mL de plasma, analisada em triplicata.

3.4.5.4 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas de calibração para cada um dos enantiômeros do LER, como descrito no item 3.4.5.1, analisadas em triplicata.

3.4.5.5 Precisão

Amostras de 25 mL de plasma branco de rato foram fortificadas com soluções padrão de LER para obtenção de soluções nas concentrações de 0,4; 125 e 250 ng de cada enantiômero por mL de plasma.

Na avaliação da precisão intra-ensaio, cinco alíquotas de 0,5 mL de cada uma dessas três soluções foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica sendo posteriormente analisadas com base em uma curva de calibração.

Para a precisão inter-ensaios, alíquotas de 0,5 mL de cada uma dessas três soluções foram analisadas durante cinco dias com base em curvas de calibração construídas simultaneamente com a análise das amostras.

3.4.5.6 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o valor real do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico sendo expressa em porcentagem, dada pela equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Da mesma forma que a precisão, é necessário um mínimo de cinco determinações por concentração sendo utilizadas, pelo menos, três diferentes concentrações. Os ensaios devem ser realizados numa mesma corrida (exatidão intra-ensaio) e em corridas diferentes (exatidão inter-ensaio).

Para os estudos da exatidão, foram analisadas amostras de plasma contendo lercanidipino nas concentrações 0,4; 125 e 250 ng de cada enantiômero por mL de plasma.

3.5 Análise farmacocinética

A disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino, foi avaliada através do modelo monocompartimental e cinética de primeira ordem

utilizando-se o *software* WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, EUA), versão 4,0.

Os dados de concentrações plasmáticas *versus* tempo após a administração oral dos enantiômeros do LER foram analisados por metodologia compartimental, considerando a absorção e a eliminação como processos de primeira ordem e com a inclusão do *lag time* (t_{lag}) na absorção. C_{max} foi definido como a concentração plasmática máxima e t_{max} como o tempo para atingir o C_{max}.

A área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (AUC^{0-∞}) foi determinada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra analisada (6h) e extrapolada até o infinito dividindo-se a última concentração quantificada pela constante de velocidade de eliminação (K_{el}).

O *software* gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos. As estimativas finais incluíram a constante de velocidade de absorção (K_a), a constante de 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/F). Os parâmetros C_{max} e t_{max} foram calculados utilizando-se as equações padrão do *software*.

3.6 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o emprego do Graphpad InStat® versão 3,0 para obtenção da mediana, média e Intervalo de Confiança (IC 95%). Os dados foram analisados com o auxílio do teste não paramétrico de Wilcoxon para dados pareados (comparação entre os enantiômeros R e S dentro do grupo) ou não pareados (comparação dos enantiômeros entre os grupos controle e solvente), com auxílio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância foi estabelecido para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise de etilbenzeno no ar

Na Figura 9 é apresentado um perfil cromatográfico obtido na análise de uma amostra de ar com etilbenzeno na concentração de 1,0 LEO (434mg/m³).

Figura 9 - Cromatograma referente à análise de etilbenzeno em ar na concentração de 1,0 LEO. (A) Dissulfeto de carbono, (B) Etilbenzeno, (C) isopropilbenzeno (PI).

4.1.1 Linearidade

O teste de linearidade, nas concentrações correspondentes a 0,2604; 1,302; 2,604 e 5,208 mg de etilbenzeno para um volume de 6 L de ar coletado, resultou em $F=2,564$, $p=0,1081$, indicando não haver desvio significativo da linearidade. A equação de regressão resultou em: $y = 1,529x - 0,02975$, apresentando $r^2 = 0,9954$. O gráfico de calibração está representado na Figura 10.

Figura 10 - Representação da curva de calibração para etilbenzeno no ar nas concentrações de 0,1 a 2 LEO.

4.1.2 Exatidão

Os valores de exatidão estão representados pelas porcentagens de recuperação de etilbenzeno (coeficientes de dessorção) apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Porcentagens de recuperação do etilbenzeno do meio de coleta, (média para 5 replicatas).

concentração (LEO)	recuperação %
0,1	82,5
0,5	81,5
1,0	90,8
2,0	86,7

LEO = Limite de Exposição Ocupacional = 434 mg/m³

4.1.3 Precisão

O resultado da avaliação da precisão do método é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Coeficientes de variação para cada concentração da curva de calibração e ponderação dos coeficientes.

concentração (LEO)	GL	CV (%)
0,1	4	14,5
0,5	4	8,4
1,0	4	1,5
2,0	4	3,9
Intervalo (0,1-2)	20	8,7 (ponderado)

LEO = Limite de Exposição Ocupacional = 434 mg/m³
GL = Graus de Liberdade

4.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) obtido pelo procedimento executado foi de 0,052 mg de etilbenzeno, correspondendo a 0,02 LEO nas condições do ensaio. Já o limite de quantificação (LQ) obtido pelo procedimento executado foi de 0,208 mg de etilbenzeno, correspondendo a 0,08 LEO nas condições do ensaio.

4.2 Determinação do etilbenzeno na câmara durante os experimentos

Os resultados das análises do etilbenzeno na câmara de exposição estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação do etilbenzeno na câmara de exposição.

Concentração teórica (mg/m ³)	Concentração obtida* (mg/m ³)
434,0	435,74
868,0	875,90

* Média geométrica de 30 coletas

4.3 Análise enantiosseletiva do lercanidipino em plasma de ratos

4.3.1 Separação dos enantiômeros

A Figura 11 apresenta os cromatogramas obtidos na análise dos isômeros (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino em plasma de rato. Os cromatogramas evidenciam a separação dos isômeros, assim como a eluição dos compostos em região livre da interferência de componentes endógenos do plasma.

Figura 11 - Análise dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de rato. Cromatogramas referentes às amostras de plasma branco (A) e fortificado com padrão interno e LER (B). (1) Amiodarona; (2) (+)-(S)-LER; (3) (-)-(R)-LER.

4.3.2 Avaliação do efeito da matriz

Os dados apresentados na Tabela 4 indicam que o efeito da matriz é praticamente ausente na análise dos enantiômeros do LER em plasma de rato.

Tabela 4 - Efeito da matriz na análise dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de rato. Resultados apresentados como média (n=15).

Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Efeito da matriz (%)		
	PI	(+) -(S)-LER	(-) -(R)-LER
	98,97		
0,4		98,98	98,94
50		99,63	99,10
100		99,66	99,05

PI = padrão interno

4.3.3 Curvas de calibração

As Figuras 12 e 13 mostram as curvas de calibração para os enantiômeros (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER, respectivamente.

Figura 12 - Gráfico de calibração para o enantiômero (+)-(S)-LER no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,2 a 400 ng mL⁻¹ de plasma.

Figura 13 - Gráfico de calibração para o enantiômero (-)-(R)-LER no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,2 a 400 ng mL⁻¹ de plasma.

4.3.4 Recuperação

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da recuperação absoluta dos enantiômeros do LER.

Tabela 5 - Recuperação absoluta do (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)
(+)ate-(S)-LER (n = 5)	0,4	97,62
	125	103,76
	250	103,09
(-(R)-LER (n = 5)	0,4	100,51
	125	93,47
	250	106,1

4.3.5 Limite de quantificação

As menores concentrações plasmáticas de (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER quantificadas no presente estudo com valores de precisão e exatidão acima de 80%, estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Limites de quantificação do (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão (%)	Exatidão (%)
(+)-(S)-LER (n = 5)	0,2	97,54	91,00
(-)-(R)-LER (n = 5)	0,2	90,68	96,00

4.3.6 Linearidade

As equações de regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) obtidos no teste de linearidade para os enantiômeros do (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Linearidade para os enantiômeros LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Equação de regressão linear (R^2)
(+)-(S)-LER	0,2 - 400	$y = 0,0336334x + 0,001587$ (0,9990)
(-)-(R)-LER	0,2 - 400	$y = 0,0309399x + 0,0017318$ (0,9996)

R^2 = coeficiente de determinação

4.3.7 Precisão e exatidão intra e inter-ensaios

Os resultados obtidos no estudo da precisão intraensaio e da precisão inter-ensaios, do método analítico em estudo, são apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 – Precisão intraensaio para (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)
(+)-(S)-LER (n = 5)	0,4	11,31
	125	12,90
	250	7,18
(-)-(R)-LER (n = 5)	0,4	11,58
	125	11,58
	250	5,90

CV = coeficiente de variação

Tabela 9 – Precisão inter-ensaios para (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	CV (%)
(+)-(S)-LER (n = 5)	0,4	4,18
	125	7,09
	250	6,62
(-)-(R)-LER (n = 5)	0,4	6,34
	125	5,40
	250	3,85

CV = coeficiente de variação

Os resultados obtidos no estudo da exatidão intra e inter-ensaios do método analítico para determinação dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de rato são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Exatidão intraensaio para (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Exatidão (%)
(+)-(S)-LER (n = 5)	0,4	106,25
	125	110,22
	250	104,53
(-)-(R)-LER (n = 5)	0,4	110,42
	125	99,06
	250	93,82

Tabela 11 – Exatidão inter-ensaios para (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Exatidão (%)
(+)-(S)-LER (n = 5)	0,4	100,50
	125	98,47
	250	96,65
(-)-(R)-LER (n = 5)	0,4	105,75
	125	94,74
	250	94,83

4.4 Análise farmacocinética

4.4.1 Grupo controle

As curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER para o grupo controle estão apresentadas, respectivamente, nos Apêndices A e B.

A Figura 14 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos animais do grupo controle (média $\pm$ erro padrão da média, n=6).

Figura 14 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos animais do grupo controle (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

A disposição cinética dos isômeros (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no grupo controle está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 - Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no **grupo controle**. Os ratos foram tratados com 3 mg kg⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(+)-(S)-lercanidipino	(-)-(R)-lercanidipino
C _{max} (ng mL ⁻¹)	18,91 22,11(13,78 - 30,44)	67,95* 72,11(57,95 - 86,26)
t _{max} (min)	65,07 63,61(48,44 - 78,78)	71,03 64,66(40,69 - 88,63)
t _{1/2 a} (min)	15,83 19,83(3,28 - 36,38)	17,80 26,61(6,34-59,55)
K _a (min ⁻¹)	0,05 0,05(0,02 - 0,09)	0,04 0,1(0,05 - 0,24)
t _{1/2} (min)	120,34 152,47(54,95 - 249,98)	159,10 143,23(72,55 - 213,91)
Kel (min ⁻¹)	0,006 0,006(0,002 - 0,010)	0,004 0,006(0,001 - 0,012)
Vd/F (L kg ⁻¹)	48,95 54,21(26,72 - 81,71)	16,63* 14,63 (8,77 - 20,49)
AUC ^{0-∞} (µg min mL ⁻¹)	5,53 6,07(3,51 – 8,63)	19,23* 20,49(15,25 – 25,76)
Cl/F (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	277,08 279,42(171,15 - 387,69)	78,25* 76,89(57,35 - 96,43)
AUC ₍₋₎ /AUC ₍₊₎		3,87 3,57(2,84 - 4,30)

* p ≤ 0,05, teste de Wilcoxon para dados pareados.

4.4.2 Grupo etilbenzeno

As curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER para o grupo exposto ao etilbenzeno na concentração de 436 mg/m³ estão apresentadas, respectivamente, nos Apêndices C e D.

A Figura 15 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos animais do grupo etilbenzeno 436 mg/m³ (média ± erro padrão da média, n=6).

Figura 15 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER do grupo etilbenzeno 436 mg/m³ (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média ± erro padrão da média.

A Tabela 13 apresenta os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do LER nos animais do grupo etilbenzeno 436 mg/m³ tratados com cloridrato de lercanidipino racêmico.

Tabela 13 - Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no **grupo etilbenzeno 436mg/m³**. Os ratos foram tratados com 3 mg kg⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(+)-(S)-lercanidipino	(-)-(R)-lercanidipino
C_{max} (ng mL ⁻¹)	23,94 31,11(8,79 - 53,44)	67,75* 73,94(41,91 - 105,97)
t_{max} (min)	32,04 37,92(14,08 - 61,76)	63,55 54,73(27,48 - 81,97)
$t_{1/2\alpha}$ (min)	5,88 7,75(1,98 - 13,52)	12,98 13,34(2,59-24,10)
K_a (min ⁻¹)	0,14 0,14(0,05 - 0,23)	0,05 0,1(0,01 - 0,22)
$t_{1/2}$ (min)	201,05 253,34(135,71 - 370,96)	294,91 301,74(191,01 – 412,47)
K_{el} (min ⁻¹)	0,003 0,003(0,002 - 0,004)	0,002 0,003(0,001 - 0,004)
V_d/F (L kg ⁻¹)	57,79 59,64(25,62 - 93,66)	17,02* 21,00 (8,28 - 33,71)
$AUC^{0-\infty}$ (µg min mL ⁻¹)	10,23 10,87(5,34 – 16,39)	34,06* 35,30(19,97 – 50,63)
Cl/F (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	147,60 166,99(79,45 - 254,53)	44,87* 49,20(27,82 - 70,59)
$AUC_{(-)}/AUC_{(+)}$		3,35 3,52(2,15 - 4,88)

* $p \leq 0,05$, teste de Wilcoxon para dados pareados.

As curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros (+)-(S)-LER e (-)-(R)-LER para o grupo exposto ao etilbenzeno na concentração de 876 mg/m³ estão apresentadas, respectivamente, nos Apêndices E e F.

A Figura 16 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos animais do grupo etilbenzeno 876 mg/m³. (média $\pm$ erro padrão da média, n=6).

Figura 16 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER do grupo etilbenzeno 876 mg/m³ (n = 6/tempo de colheita). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

Na Tabela 14 são apresentados os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do LER nos animais do grupo etilbenzeno 876 mg/m³ tratados com cloridrato de lercanidipino racêmico.

Tabela 14 - Disposição cinética do (+)-(S) e (-)-(R)-lercanidipino no **grupo etilbenzeno 876mg/m³**. Os ratos foram tratados com 3 mg kg⁻¹ de cloridrato de lercanidipino racêmico. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(+)-(S)-lercanidipino	(-)-(R)-lercanidipino
C _{max} (ng mL ⁻¹)	16,90 16,80(10,22 - 23,38)	53,53* 70,59(31,60 - 109,59)
t _{max} (min)	52,88 57,01(32,39 - 81,63)	54,09 61,99(30,70 - 93,28)
t _{1/2 a} (min)	11,34 13,05(4,86 - 21,24)	9,92 14,63(2,43-26,82)
K _a (min ⁻¹)	0,06 0,07(0,03 - 0,12)	0,07 0,06(0,03 - 0,10)
t _{1/2} (min)	232,82 229,03(157,55 - 300,50)	212,10 272,01(32,40 – 511,63)
Kel (min ⁻¹)	0,003 0,003(0,002 - 0,005)	0,003 0,004(0,002 - 0,006)
Vd/F (L kg ⁻¹)	76,05 87,04(47,37 - 126,71)	23,11* 21,53 (11,27 - 31,78)
AUC ^{0-∞} (µg min mL ⁻¹)	6,97 6,70(3,10 – 10,33)	23,79* 28,25(11,40 – 45,10)
Cl/F (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	258,21 290,20(126,68 - 453,73)	65,57* 71,29(26,87 - 115,71)
AUC ₍₋₎ /AUC ₍₊₎		4,26 4,25(3,19 - 5,31)

* p ≤ 0,05, teste de Wilcoxon para dados pareados.

4.4.3 Avaliação da influência da exposição ao etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do lercanidipino em ratos tratados com cloridrato de lercanidipino racêmico.

A Figura 17 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos animais dos grupos controle, etilbenzeno 436 mg/m³ e etilbenzeno 876 mg/m³.

Figura 17 - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do LER nos grupos controle, etilbenzeno 436 mg/m³ e etilbenzeno 876 mg/m³. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (n = 6/tempo de colheita).

A Tabela 15 apresenta a disposição cinética dos enantiômeros do LER nos grupos controle, etilbenzeno 436 mg/m³ e etilbenzeno 876 mg/m³. Os parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero do LER relativos aos grupos etilbenzeno 436 mg/m³ e etilbenzeno 876 mg/m³ foram comparados com aqueles do grupo controle empregando o teste de Kruskal- Wallis, com pós-teste de Dunn ($p \leq 0,05$).

Tabela 15 - Avaliação da influência do etilbenzeno na farmacocinética dos enantiômeros do lercanidipino.

Parâmetro	(+)-(S)-lercanidipino			(-)-(R)-lercanidipino		
	controle	etilbenzeno 436 mg/m ³	etilbenzeno 876 mg/m ³	controle	etilbenzeno 436 mg/m ³	etilbenzeno 876 mg/m ³
C _{max} (ng mL ⁻¹)	18,91 22,11(13,78-30,44)	23,94 31,11(8,79-53,44)	16,90 16,80(10,22-23,38)	67,95 72,11(57,95-86,26)	67,75 73,94(41,91-105,97)	53,53 70,59(31,60-109,59)
t _{max} (min)	65,07 63,61(48,44-78,78)	32,04 37,92(14,08-61,76)	52,88 57,01(32,39-81,63)	71,03 64,66(40,69-88,63)	63,55 54,73(27,48-81,97)	54,09 61,99(30,70-93,28)
t _{1/2a} (min)	15,83 19,83(3,28-36,38)	5,88 7,75(1,98-13,52)	11,34 13,05(4,86-21,24)	17,80 26,61(6,34-59,55)	12,98 13,34(2,59-24,10)	9,92 14,63(2,43-26,82)
K _a (min ⁻¹)	0,05 0,05(0,02-0,09)	0,14 0,14(0,05-0,23)	0,06 0,07(0,03-0,12)	0,04 0,1(0,05-0,24)	0,05 0,1(0,01-0,22)	0,07 0,06(0,03-0,10)
t _{1/2} (min)	120,34 152,47(54,95-249,98)	201,05 253,34(135,71-370,96)	232,82 229,03(157,55-300,50)	159,10 143,23(72,55-213,91)	294,91 301,74(191,01-412,47)	212,10 272,01(32,40-511,63)
K _{el} (min ⁻¹)	0,006 0,006(0,002-0,010)	0,003 0,003(0,002-0,004)	0,003 0,003(0,002-0,005)	0,004 0,006(0,001-0,012)	0,002 0,003(0,001-0,004)	0,003 0,004(0,002-0,006)
Vd/F (L Kg ⁻¹)	48,95 54,21(26,72-81,71)	57,79 59,64(25,62-93,66)	76,05 87,04(47,37-126,71)	16,63 14,63 (8,77-20,49)	17,02 21,00 (8,28-33,71)	23,11 21,53 (11,27-31,78)
AUC ^{0-∞} (µg min mL ⁻¹)	5,53 6,07(3,51-8,63)	10,23 10,87(5,34-16,39)	6,97 6,70(3,10-10,33)	19,23 20,49(15,25-25,76)	34,06 35,30(19,97-50,63)	23,79 28,25(11,40-45,10)
Cl/F (mL min ⁻¹ Kg ⁻¹)	277,08 279,42(171,15-387,69)	147,60 166,99(79,45-254,53)	258,21 290,20(126,68-453,73)	78,25 76,89(57,35-96,43)	44,87 49,20(27,82-70,59)	65,57 71,29(26,87-115,71)
AUC ₍₋₎ /AUC ₍₊₎	controle	etilbenzeno 436 mg/m ³		etilbenzeno 876 mg/m ³		
	3,87 3,57(2,84 - 4,30)	3,35 3,52(2,15 - 4,88)		4,26 4,25(3,19 - 5,31)		

* P ≤ 0,05, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao etilbenzeno estão bem descritos na literatura (ACGIH, 2006). Não há dados referentes à influência do etilbenzeno na disposição cinética do LER administrado a ratos ou a outros animais de experimentação. O presente estudo avalia pela primeira vez a influência da exposição ao etilbenzeno, por inalação, na disposição cinética dos enantiômeros do LER em ratos.

Os animais do grupo controle foram contidos na câmara de exposição, expostos apenas ao ar, durante 6 horas por dia, por um período de cinco dias, tendo sido tratados no quinto dia com dose única oral de cloridrato de lercanidipino racêmico. Os animais do grupo exposto ao etilbenzeno foram contidos da mesma forma e expostos a 436 e 876 mg/m³ de etilbenzeno por cinco dias consecutivos, durante 6 horas por dia, tratados no quinto dia com dose única oral de cloridrato de lercanidipino racêmico.

As vantagens da exposição apenas pelo nariz são utilizar menor quantidade de material a ser inalado, produzir exposição mais uniforme entre os animais, ser mais facilmente controlada e evitar a penetração do solvente por outras vias. No entanto, há a desvantagem da limitação do tempo de experimentação, devido ao estresse provocado pela contenção do animal, em geral limitado ao máximo de seis horas (HOLÄNDER, 1988; KENNEDY; VALENTINE, 1994).

O método validado para determinação de etilbenzeno em ar apresentou características de sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade que atendem às necessidades dos objetivos do trabalho, sendo uma técnica rápida e de fácil execução (Tabelas 1 e 2). A concentração de etilbenzeno no ar para os grupos expostos teve reprodutibilidade satisfatória, resultando em valores médios próximos ao esperado em relação à concentração a que se pretendeu expor os animais (Tabela 3).

A investigação da enantiosseletividade na disposição cinética de fármacos usados na terapêutica exige a disponibilidade de métodos analíticos com capacidade de discriminação quiral e com limites de confiança compatíveis com as baixas concentrações plasmáticas dos enantiômeros.

Jabor et. al. (2003) validaram um método de determinação dos enantiômeros do lercanidipino empregando HPLC acoplado à detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) em plasma humano. No presente trabalho foi feita uma adaptação da metodologia de análise do LER para se ter aplicabilidade na análise

do plasma de rato. O estudo de efeito da matriz mostrou que o plasma de rato não interfere no processo de ionização dos enantiômeros do LER e do padrão interno (Tabela 4).

A separação direta dos enantiômeros do lercanidipino foi obtida na coluna de fase estacionária quiral Chiralpak AD. A ordem de eluição dos enantiômeros nesta coluna, na sequência (+)-(S) e (-)-(R)-LER, foi derivada do estudo de Jabor et. al. (2004). O método empregando detecção por espectrometria de massas mostrou-se rápido com tempos de retenção de 6,33 e 6,88 min (Figura 11) para a eluição dos enantiômeros (+)-(S) e (-)-(R)-LER respectivamente, com fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina (95:5:0,1%, v/v/v).

O estudo da recuperação (Tabela 5) revelou valores maiores que 90% e independentes das concentrações para ambos os enantiômeros do lercanidipino analisados por procedimento de extração líquido-líquido, realizado em pH básico e com hexano:isopropanol (99:1, v/v) como solvente extrator.

O limite de quantificação de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ (Tabela 6) para ambos os enantiômeros permite inferir que o método tem aplicação em estudos de dose única com vistas à investigação da disposição cinética do lercanidipino em ratos.

A linearidade do método observada para os dois enantiômeros do LER teve uma ampla faixa de concentração com coeficientes de determinação dentro dos valores aceitáveis (Tabela 7).

Nos estudos de precisão intra e inter-ensaios, os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 15 % (Tabelas 8 e 9), indicando alta precisão do método analítico.

Os resultados obtidos nos testes de exatidão intra e inter-ensaios apresentados nas Tabelas 10 e 11 estão dentro do intervalo de erro aceitável de 10%, demonstrando que o método, além de preciso, é bastante exato.

O método desenvolvido e validado foi empregado na investigação da enantiosseletividade na disposição cinética do LER administrado sob forma de mistura racêmica, em dose única aos ratos dos grupos controle, etilbenzeno 436 mg/m^3 e etilbenzeno 876 mg/m^3 .

A farmacocinética dos enantiômeros do lercanidipino administrado a ratos foi até então reportada apenas por Farina et. al. (1997) empregando o [^{14}C] lercanidipino.

A disposição cinética do LER é enantiosseletiva nos ratos Wistar do grupo controle com acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER ($p \leq 0,05$; teste de Wilcoxon para dados pareados), considerado de menor atividade anti-hipertensiva. O acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER, traduzido pelo parâmetro $AUC^{0-\infty}$ ($19,23$ vs $5,53 \mu\text{g min mL}^{-1}$) é conseqüente do menor volume de distribuição ($16,63$ vs $48,95 \text{ L kg}^{-1}$) e do menor *clearance* aparente ($78,25$ vs $277,08 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$); apresentados na Tabela 12.

São poucos os dados referentes à enantiosseletividade na disposição cinética, ao metabolismo e aos sistemas enzimáticos envolvidos na eliminação do LER administrado a ratos ou a outros animais de experimentação. Farina et al. (1997) relatam razões enantioméricas de concentrações plasmáticas (-)-(R)/(+)-(S)-LER, variando de 3,8 a 6,2 na administração de dose oral de 2 mg kg^{-1} . No presente estudo, as razões de concentrações plasmáticas (-)-(R)/(+)-(S)-LER variaram de 2,84 a 4,30 (Tabela 12) para os ratos do grupo controle.

Contrariamente, em humanos, Jabor et al. (2004) sugerem o acúmulo plasmático do enantiômero (+)-(S)-LER na investigação de voluntários sadios tratados com cloridrato de lercanidipino racêmico. A razão das concentrações plasmáticas (+)/(-), reportada pelos autores foi de 1,21.

McClellan e Jarvis (2000) reportam que o LER é altamente ligado às proteínas do plasma humano ($>98\%$). Não há dados relativos à enantiosseletividade na ligação do lercanidipino às proteínas do plasma de ratos. No presente estudo foi observado aumento significativo do volume aparente de distribuição do enantiômero (+)-(S)-LER ($48,95$ vs $16,63 \text{ L kg}^{-1}$), indicando que possa haver uma maior ligação do (-)-(R)-LER às proteínas do plasma. Outro mecanismo seria a ligação preferencial do enantiômero (+)-(S)-LER às proteínas do tecido.

A contribuição da excreção renal é em torno de 11% na eliminação do lercanidipino administrado a ratos (FARINA et al., 1997). Conseqüentemente, o metabolismo também representa a principal via de eliminação do anti-hipertensivo em ratos. O maior *clearance* aparente ($277,08$ vs $78,25 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$; Tabela 12) do enantiômero (+)-(S)-LER permite sugerir enantiosseletividade no metabolismo do LER em ratos.

Os animais foram expostos a duas diferentes concentrações de etilbenzeno na câmara de exposição, escolhidas em função do limite de exposição ocupacional proposto para o ser humano no ambiente de trabalho. Um dos grupos foi exposto à

concentração equivalente ao TLV-TWA de 434 mg/m³ e outro grupo exposto ao etilbenzeno na concentração equivalente ao dobro do TLV-TWA (868 mg/m³). Esta exposição foi feita durante seis horas por dia, por cinco dias consecutivos, tendo sido tratados no quinto dia com cloridrato de lercanidipino racêmico na dose de 3 mg kg⁻¹. A concentração real analisada na câmara de exposição foi de 436 mg de etilbenzeno/m³ de ar para os animais expostos a 1 LEO de etilbenzeno (Tabela 3) e de 876 mg/m³ para os animais expostos a 2 LEO de etilbenzeno (Tabela 3).

A disposição cinética do LER para os animais dos grupos etilbenzeno 436 mg/m³ e 876 mg/m³, à semelhança do grupo controle, foi enantiosseletiva com observação de acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER ($p < 0,05$; teste de Wilcoxon para dados pareados). O acúmulo plasmático do enantiômero (-)-(R)-LER, traduzido pelo parâmetro $AUC^{0-\infty}$, respectivamente para os grupos etilbenzeno 436 mg/m³ e 876 mg/m³ (34,06 vs 10,23 $\mu\text{g min mL}^{-1}$ e 23,79 vs 6,97 $\mu\text{g min mL}^{-1}$) é conseqüente do menor volume de distribuição (17,02 vs 57,79 L kg⁻¹ e 23,11 vs 76,05 L kg⁻¹) e do menor *clearance* aparente (44,87 vs 147,60 mL min⁻¹ kg⁻¹ e 65,57 vs 258,21 mL min⁻¹ kg⁻¹) apresentados nas Tabelas 13 e 14. Ressalta-se ainda que não foram observadas diferenças nas razões de $AUC_{(-)/(+)}$ entre os grupos controle (3,87), etilbenzeno 436 mg/m³ (3,35) e etilbenzeno 876 mg/m³ (4,26); (Tabela 15).

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do LER não mostram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os animais expostos ao etilbenzeno nas concentrações 434 e 868 mg/m³ apresentados na Tabela 15.

Estudos envolvendo a indução enzimática pelo etilbenzeno (SERRON; DWVEDI; BACKES, 2000; YUAN et al., 1994, 1997) utilizaram dose única ou dose por três dias consecutivos sendo que a via de administração foi a intraperitoneal, todos na dose de 10 mmol kg⁻¹. Não há relatos na literatura de indução enzimática pelo etilbenzeno pela via inalatória.

Nakajima e Wang (1994) observaram que a exposição ao tolueno, solvente orgânico semelhante ao etilbenzeno, possui um efeito indutor em ratos a partir de 1000 ppm com duração de seis horas de exposição, valor muito superior ao TLV-TWA que é de 50 ppm.

Matheus (2007), em um estudo de interação do tolueno na disposição cinética do verapamil em ratos, por inalação, observou que a exposição ao tolueno nas

concentrações de 94, 188 e 376 mg/m³ não altera a farmacocinética dos enantiômeros do verapamil em ratos.

Concluindo, os dados obtidos no presente estudo permitem inferir que a exposição ao etilbenzeno em concentrações igual ou duas vezes superior ao TLV-TWA não alteram a disposição cinética dos enantiômeros do LER. Considerando o número limitado de animais investigados (n=6 replicatas para cada tempo de coleta), estudos empregando maiores concentrações de etilbenzeno são necessários para confirmar a não interferência do solvente na disposição cinética do LER em ratos.

6 CONCLUSÕES

1- O método de análise do etilbenzeno em ar mostrou-se sensível, preciso e exato com aplicação em estudos de exposição de ratos ao solvente por inalação em câmara de exposição.

2- O método, desenvolvido e validado para a análise dos enantiômeros do lercanidipino em plasma de ratos, apresenta parâmetros de confiança compatíveis com o estudo de enantiosseletividade na farmacocinética do lercanidipino administrado sob a forma racêmica a ratos em regime de dose única.

3- A disposição cinética do lercanidipino é enantiosseletiva nos ratos expostos ao ar (grupo controle) e ao etilbenzeno nas concentrações de 434 mg/m³ e 868 mg/m³, em câmara de exposição apenas pelo nariz, com observação de razões enantioméricas de concentrações plasmáticas (-)-(R)/(+)-(S)-LER de 3,87, 3,35 e 4,26 respectivamente.

4- A exposição ao etilbenzeno nas concentrações de 434 mg/m³ e 868 mg/m³ não altera a farmacocinética dos enantiômeros do LER administrado a ratos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACANFORA, D.; GHEORGHIADU, M.; ROTIROTI, D.; TROJANO, L.; RENGO, G.; FURGI, G.; PAPA, A.; PICONE, C.; NICOLINO, A.; ODIERNA, L.; RENGO, F. Acute dose-response, double-blind, placebo-controlled pilot study of lercanidipine in patients with angina pectoris. **Curr. Ther. Res. Clin. Exper.**, New York, v. 61, n.5, p. 255-65, 2000.

ACGIH - AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Documentation of the TLVs® and BEIs® with other worldwide occupational exposure values**. Cincinnati, 2006. 1 CD-ROM.

AMBROSINI E.; CIRCO A. Activity of lercanidipine administered in single and repeated doses once daily as monitored over 24 hours in patients with mild to moderate essential hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, p.S16-S20, 1997.

BARCIELLI, M.; DOLFINI, E.; FARINA, P.; LEONI, B.; TARGA, G.; VINACCIA, V.; TAJANA, A. Clinical pharmacokinetics of lercanidipine. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, Suppl. 2, p.S1-S15, 1997.

BORASO, A.; BERNOCCHI, P.; BENIGNO, M.; PEPI, P.; FERRARI, F.; CECONI, C.; FERRARI, R. The time-dependence of the cardioprotective effects of lercanidipine. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, Suppl. 1, p.S69-S77, 1997.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de jun. 2003.

BROCKS, D. R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester, v. 27, p. 387-406, 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.**, Baltimore, v. 27(2), p. 246-249, 1999.

CAFIERO, M.; GIASI, M. Long term (12 month) treatment with lercanidipine in patients with mild to moderate hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 26, p.S46-S50, 1997.

CARGNONI, A.; BENIGNO, M.; FERRARI, F.; PEDERSINI, P.; CURELLO, S.; PEPI, P.; FERRARI, R. Effects of lercanidipine and its enantiomers on ischemia and reperfusion. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, Suppl.1, p.S48-S62, 1997.

CERBAI, E.; SARTIANI, L.; DEPAOLI, P.; MATUCCI, R.; DAVOLI, G.; DICIOLLA, F.; LISI, G.; MACCHERINI, M.; SANI, G.; MUGELLI, A. Electrophysiologic effects of lercanidipine on repolarizing potassium currents. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 36 (5), p.584-91, 2000.

COMINACINI, L.; PASINI, A. F.; PASTORINO, A. M.; GARBIN, U.; DAVOLI, A.; RIGONI, A.; CAMPAGNOLA, M.; TOSETTI, M. L.; ROSSATO, P.; GAVIRAGHI, G. Comparative effects of different dihydropyridines on the expression of adhesion molecules induced by TNF- α on endothelial cells. **J. Hypertension**, London, v. 17 (12), p.1837-41, 1999.

CORSINI, A.; BONFATTI, M.; QUARATO, P.; ACCOMAZZO, M. R.; RAITERI, M.; SARTANI, A.; TESTA, R.; NICOSIA, S.; PAOLETTI, R.; FUMAGALLI, R. Effect of the new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers on the migration and proliferation of arterial myocytes. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 28 (5), p.687-94, 1996.

DE GIORGIO, L. A.; ORLANDINI, F.; MALASOMA P.; ZAPPA A. Double-blind, crossover study of lercanidipine versus amlodipine in the treatment of mild-to-moderate essential hypertension. **Curr. Ther. Res.**, New York, v. 60 (10), p.511-20, 1999.

FARINA, P.; TARGA, G.; LEONI, B.; TAJANA, A. Pharmacokinetics of lercanidipine in animals. Absorption, plasma concentrations, and excretion after administration of [^{14}C]Lercanidipine to rats, mice, rabbits, and dogs. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, Suppl.1, p.S86-S96, 1997.

GUARNERI, L.; ANGELICO, P.; IBBA, M.; POGGESI, E.; TADDEI, C.; LEONARDI, A.; TESTA, R. Pharmacological in vitro studies of the new 1,4-dihydropyridine calcium antagonist lercanidipine. **Drug Res.**, Aulendorf, v. 46 (1), p.15-24, 1996.

HENDERSON, R. F. Aromatic Hydrocarbons-Benzene and other Alkylbenzenes. In: HARRIS, R. et al., (Ed.). **Patty's industrial hygiene and toxicology** 5th. Ed. New York: Willey-Interscience, 2005. 1 CD-ROM.

HERBETTE L.G.; VECCHIARELLI, M.; SARTANI, A.; LEONARDI, A. Lercanidipine: short plasma half-life, long duration of action and high cholesterol tolerance. Updated molecular model to rationalize its pharmacokinetic properties. **Blood Press. Suppl.**, Stockholm, v. 2, p.10-7, 1998.

HOLÄNDER, W. Exposure facilities and aerosol generation and characterization for inhalation experiments. In Mohr, U. (ed.). **Inhalation Toxicology**. New York, Springer-Verlag, 1988, p. 67-85.

HUTZLER, J. M.; TRACY, T. S. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v. 30 (4), p. 355-362, 2002.

INGELMAN-SUNDERBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.29 (4), p. 570-573, 2001.

JABOR, V. A. P.; COELHO, E. B.; IFA, D. R.; BONATO, P. S.; SANTOS, N. F. G.; LANCHOTE, V. L. Enantioselective determination of lercanidipine in human plasma for pharmacokinetics studies by normal-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatograph B**, Amsterdam, v. 796, p. 429-437, 2003.

JABOR, V. A. P.; COELHO, E. B.; LANCHOTE, V. L. Enantioselective pharmacokinetics of lercanidipine in healthy volunteers. **Journal of Chromatograph B**, Amsterdam, v. 813, p. 343-346, 2004.

JULIUS, S. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 21 (6), p.886-93, 1993.

KARIN, A. Enantioselective assays in comparative bioavailability studies of racemic drugs formulation: nice to know or need to know? **J Clin Pharmacol**, Thousand Oaks, v.36 (6), p.490-499, 1996.

KENNEDY JR, G.L., VALENTINE, R. Inhalation Toxicology. *In*. Hayes, A. W. (ed). **Principles and Methods of Toxicology**, 3rd ed. New York, Raven Press, 1994, p. 805-838.

KROEMER, H. K.; FROMM, M. F.; EINCHELBAUM, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action: effects of enzyme inhibition and induction. **Ther Drug Monit**, New York, v. 18 (4), p. 388-392, 1996.

LAAKSO, M.; LEHTO, S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 137, p.S65-S73, 1998.

LEPERA, J. S.; COLACIOPPO, S. Rapid determination of desorption efficiency and analysis of solvent mixtures for occupational exposure studies. **Chromatographia**, New York, v. 55, p. 463-66, 2002.

LEONARDI, A.; POGGESI, E.; TADDEI, C.; GUARNERI, L.; ANGELICO, P.; ACCOMAZZO, M. R.; NICOSIA, S.; TESTA, R. In vitro calcium antagonist activity of lercanidipine and its enantiomers. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, New York, v. 29, Suppl.1, p.S10-18, 1997.

MANCIA, G.; OMBONI, S.; ZANCHETTI, A. Clinical advantages of lipophilic dihydropyridines. **Blood Press.**, Stockholm, v. 2, Suppl. 2, p. 23-6, 1998.

MATHEUS, F. H. Influência de solvents na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivo do verapamil em ratos. 2007. 99f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007

McCLELLAN, K.J.; JARVIS, B. Lercanidipine – A Review of its Use in Hypertension. **Drugs**, Auckland, v. 60 (5), p.1123-40, 2000.

MEHVAR, R.; REYNOLDS, J. Reversal of stereoselectivity in the hepatic availability of verapamil in isolated perfused rat livers. **Drug Metab. Dispos.**, Baltimore, v.24 (10), p.1089-1094, 1996.

NAKAJIMA, T.; AOYAMA, T. Polymorphism of drug-metabolizing enzymes in relation to individual susceptibility to industrial chemicals. **Industrial Health**, Kawasaki, v. 38 (2), p.143-152, 2000.

NAKAJIMA, T.; WANG, R. S. Induction of cytochrome P450 by toluene. **Int. J. Biochem.**, Amsterdam, v. 26 (12), p. 1333-1340, 1994.

NIOSH Manual of Analytical Methods(NMAM). Hydrocarbons, aromatic Method 1501. 4th ed. (3), 2003. Disponível em <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/>. Visitado em 14/12/2006.

NIOSH Guidelines for Air Sampling and Analytical Method Development and Evaluation. U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati, 1995.

PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C. D., ed. **Casaret & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 6.ed. New York: McGraw-Hill, p.133-224, 2001.

RAPPAPORT, S. Interpreting Levels of Exposures to Chemical Agents. In: HARRIS, R. et al., (Ed.). **Patty's Industrial hygiene and Toxicology**. 5th. Ed. New York: Willey-Interscience, 2005. 1 CD-ROM.

SABBATINI M.; TOMASSONI, D.; AMENTA F. Influence of treatment with Ca^{2+} antagonists on cerebral vasculature on spontaneously hypertensive rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, v. 122 (8), p.795-809, 2001.

SAMS, C.; LOIZOU, G. D.; COCKER, J.; LENNARD, M. S. Metabolism of ethylbenzene by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 147, p.253-260, 2004.

SERRON, S. C; DWIVEDI, N. BACKES, W.L. Ethylbenzene Induces Microsomal Oxygen Free Radical Generation: Antibody-directed Characterization of the responsible Cytochrome P450 Enzymes. **Toxicology and Applied Pharm.**, San Diego, v. 164, p.305-311, 2000.

SIRONI, G.; MONTAGNA, E.; GRETO L.; BIANCHI G.; LEONARD A.; TESTA R. Antihypertensive effects of lercanidipine in experimental hypertensive rats and dogs. **Drug Res.**, Aulendorf, v. 46 (1), p.145-52, 1996.

TESTA, R.; LEONARDI, A.; TAJANA, A.; RISCASSI, E.; MAGLIOCCA, R.; SARTANI, A. Lercanidipine (Rec 15/2375): A novel 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonist for Hypertension. **Cardiovascular Drug Reviews**, New York, v. 15 (3), p 187-219, 1997.

TOYO-OKA T.; NAYLER, W. G. Third generation calcium entry blockers. **Blood Press**, Stockholm, v. 5 (4), p.206-8, 1996.

VAN ZWIETEN, P. A.; MANCIA, G. Third generation calcium antagonists: further developments. **Blood Press**, Stockholm, v. 5, p.376-7, 1996.

WILLIAMS, B.; POULTER, N. R.; BROWN, M. J.; DAVIS, M.; McINNES, G. T.; POTTER, J. F.; SEVER, P. S.; McG THOM, S. Guidelines for management of hypertension: report of the fourth working party of the British Hypertension Society, 2004—BHS IV. **Journal of Human Hypertension**, London, v. 18, p.139-185, 2004.

YUAN, W.; CAWLEY, G. F.; EYER, C.S.; BACKES, W. L. Induction of P450 3A by ethylbenzene without altering RNA levels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Amsterdam, v. 202 (3), p.1259-65, 1994.

YUAN, W.; SERRON, S. C.; HADDICAN, M. M.; CAWLEY, G. F.; EYER, C.S.; BACKES, W. L. Ethylbenzene modulates the expression of different cytochrome P-450 isozymes by discrete multistep processes. **Biochim. Biophys. Acta.** Amsterdam, v. 1334, p.361-72, 1997.

ZHOU, Q.; YAO, T. W.; ZENG, S. Effects of stereochemical aspects on drug interaction in pharmacokinetics. **Acta Pharmacol. Sin.**, Beijing, v. 23 (5), p.385-392, 2002.

APÊNDICES

Apêndice A - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, grupo controle(n=6).

Apêndice B - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo controle(n=6).

Apêndice C - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 436 mg/m³(n=6).

Apêndice D - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 436 mg/m³(n=6).

Apêndice E - Concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 876 mg/m³(n=6).

Apêndice F - Concentrações plasmáticas do enantiômero (-)-(R)-lercanidipino vs tempo, grupo etilbenzeno 876 mg/m³(n=6).

ANEXO

Anexo A - Protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr. nº 15/2006 – Animais em Pesquisa

Interessado: MARCEL TAVARES DE FARIAS

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ SALVADOR LEPERA

Título do Projeto: Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva da lercanidipina em ratos

Parecer nº 17/2006 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva da lercanidipina em ratos", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 24 de maio de 2006.

Profª. Drª. MARIA VIRGINIA S. GOMES DE OLIVEIRA
Coordenadora do CEP