# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais

Juciane Lauren Cavalcanti Cardoso

Ribeirão Preto 2012

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

# FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientado(a):** Juciane Lauren Cavalcanti. Cardoso

Orientador(a): Prof. Dr. José Salvador Lepera

Ribeirão Preto 2012 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.

> Cardoso, Juciane Lauren Cavalcanti Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais. Ribeirão Preto, 2012.

91 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Lepera, José Salvador.

1. Combustíveis. 2. Fármacos quirais. 3. Enantiosseletividade.

#### FOLHA DE APROVAÇÃO

Juciane Lauren Cavalcanti Cardoso

Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Prof. Dr. José Salvador Lepera

Aprovado em:		
	Banca Examinadora	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	

# Dedico,

Primeiramente a Deus por me conceber a essência da vida e estar sempre ao meu lado

Dedico aos meus pais (Wanda e Benê) pela educação e exemplo a que me foi dado, pelo apoio, incentivo e amor,

Dedico a minha avó (Zoraide in memorian) que está sempre presente,

Dedico ao André pelo amor e paciência.

### Agradecimentos

Ao meu professor e orientador Prof. Dr. José Salvador Lepera pela orientação, ensinamentos em todas as etapas do estudo pela sua amizade.

A minha amiga Natalícia pela sua paciência, amizade, apoio, experiência e por sempre estar disposta a me ajudar.

Aos meus amigos Rodrigo e Leonardo pela valiosa ajuda nos experimentos, pelo apoio e pela amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Estela, Daniel, Ana Leonor, Carol, Natália, Francine, Glauco, Otávio e Giovanna pela convivência.

Ao Natalino pelos ensinamentos e pelo apoio.

A Maria Paula, por tudo o que me ensinou, pela paciência, pela ajuda e o mais importante a sua amizade.

A Adriana e o Eduardo pela ajuda nas análises.

A Valéria pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos funcionários da pós graduação da FCFRP-USP pela orientação e disposição em ajudar.

Aos colegas da pós graduação e aos professores da FCFRP-USP pela amizade e convivência.

A Capes pela concessão da bolsa.

A FAPESP pelo auxílio dado ao projeto.

A todos os funcionários da FCFRP-USP.

#### RESUMO

CARDOSO, J. L. C. Título Influência da exposição crônica a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais. 2012. 91f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A maioria dos agentes terapêuticos, frequentemente prescritos são formulados e comercializados sob a forma racêmica, embora para alguns deles, já tenha sido demonstrado que os efeitos farmacológicos e ou tóxicos estejam relacionados apenas a um dos enantiômeros. Além disso, é conhecido o fato de que os enantiômeros podem apresentar perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes. O estudo avaliou a influência da exposição inalatória ao vapor de gasolina e ao etanol combustível na farmacocinética enantiosseletiva dos fármacos verapamil, ibuprofeno e fluoxetina. Ratos machos Wistar foram divididos em 09 grupos: controle, gasolina, etanol combustível. A exposição aos solventes foi realizada em câmara de exposição do tipo apenas pelo nariz, durante 6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 6 semanas. A análise das AUCs foram calculadas diretamente no intervalo de zero a infinito com base na Quadratura de Gauss-Laguerre. As concentrações correspondentes aos tempos foram estimadas por interpolação polinomial. A comparação dos valores de AUC e Cl/f obtidos para cada fármaco e para cada Grupo exposto e seu respectivo Controle, foi realizada através da construção de Intervalos de Confiança, ao nível de 95%. A farmacocinética do verapamil, do ibuprofeno e da fluoxetina é enantiosseletiva. Os dados mostram que a exposição inalatória de ratos ao etanol combustível na concentração de 2 LEO-STEL mostrou indução do CYP2C através da redução do AUC e do aumento do clearance aparente do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento da AUC e redução do clearance aparente do enantiômero (-)-(R)fluoxetina e indução do CYP3A evidenciada por redução dos valores de AUC e aumento dos valores de clearance aparente de ambos os enantiômeros do verapamil. A exposição inalatória de ratos à gasolina na concentração de 2-LEO-TWA também mostrou indução do CYP2C denotada pela redução do AUC e do aumento do clearance aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de clearance aparente de ambos enantiômeros da fluoxetina e, em não alteração do CYP3A evidenciada pela obtenção de valores de AUC e *clearance* aparente do verapamil similares aos do grupo controle.

Palavras-chave: verapamil, ibuprofeno, fluoxetina, etanol, gasolina, CYP3A, CYP2C, CYP2D.

#### ABSTRACT

CARDOSO, J. L. C. Influence of chronic exposure to automotive fuels in the activity of CYP3A, CYP2C, CYP2D in rats treated with chiral. 2012. 91f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Most therapeutic agents frequently used are formulated and sold under the racemic form, although for some of them, it has been demonstrated that the pharmacological or toxic and are associated only with one of the enantiomers. The study evaluated the influence of inhalation exposure to vapor of gasoline and ethanol in the enantioselective pharmacokinetics of the drug verapamil, ibuprofen and fluoxetine. Male Wistar rats were divided into 09 groups: control, gasoline, ethanol. The exposure was carried out in solvent exposure chamber by nose only exposure system for 6 hours / day, five days per week for six weeks. The analysis of the AUC were calculated directly in the range of zero to infinity on the basis of Quadrature Gauss-Laguerre. The concentrations corresponding to the times were estimated by polynomial interpolation. The comparison of AUC and Cl/f obtained for each drug and for each exposed group and its respective control, was accomplished through the construction of confidence intervals, at 95%. In conclusion, the pharmacokinetics of verapamil, ibuprofen and fluoxetine is enantioselective. The data show that inhalation exposure of rats to ethanol at a concentration of 2-LEO STEL showed induction CYP2C by reducing of the AUC and increase the apparent *clearance* of the enantiomer (+)-(S)-ibuprofen, inhibition of CYP2D indicated AUC increase and the reduction in the apparent clearance of the enantiomer (-)-(R)-fluoxetine and CYP3A induction as evidenced by reduction in AUC and increase and the values of apparent clearance of both enantiomers of verapamil. Inhalation exposure of rats to gasoline in a concentration of 2-LEO-TWA also showed induction CYP2C denoted by the reduction of AUC and increase and the apparent *clearance* of both enantiomers of ibuprofen, inhibition of CYP2D indicated by the increase in AUC and reduction values of apparent *clearance* of both enantiomers of fluoxetine and does not change the CYP3A evidenced by obtaining AUC and apparent *clearance* of verapamil similar to the control group.

Keywords: verapamil, ibuprofen, fluoxetine, ethanol, gasoline, CYP3A, CYP2C, CYP2D.

#### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Metabolismo do verapamil	3
Figura 2. Metabolismo do Ibuprofeno	5
Figura 3. Base da câmara de exposição	13
Figura 4. Câmara interna	14
Figura 5. Montagem do anel externo e trompetes	14
Figura 6. Montagem da câmara externa	15
Figura 7. Contentor e seu acoplamento	16
Figura 8. Dispositivo gerador da atmosfera experimental	17
Figura 9. Câmara de exposição apenas pelo nariz	18
Figura 10. Locação da câmara	19
Figura 11. Procedimento de extração líquido-líquido do verapamil e norverapamil em plasma	26
Figura 12. Procedimento de extração líquido-líquido do ibuprofeno em plasma	29
Figura 13. Procedimento de extração líquido-líquido da fluoxetina em plasma	34
Figura 14. Curva de calibração para o enantiômero (-)-(S)-verapamil	41
Figura 15. Curva de calibração para o enantiômero (+)-(R)-verapamil	41
Figura 16. Curva de calibração para o enantiômero (-)-(S)-norverapamil	42
Figura 17. Curva de calibração para o enantiômero (+)-(R)-norverapamil	42
Figura 18. Cromatograma referente a amostra de plasma animal tratado com verapamil racêmico, plasma branco enriquecido com verapamil racêmico	43
Figura 19. Cromatograma referente a amostra de plasma branco, plasma branco enriquecido com ibuprofeno racêmico e animal tratado com ibuprofeno racêmico	46
Figura 20. Curva de calibração para o enantiômero (-)-(R)-ibuprofeno	47

Figura 21. Curva de calibração para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno	47
Figura 22. Cromatograma referente a amostra de plasma branco	52
Figura 23. Cromatograma referente a amostra de plasma fortificado com fluoxetina	53
Figura 24. Cromatograma referente a amostra de plasma de animal tratado com fluoxetina racêmica	54
Figura 25. Espectro de massa da fluoxetina	55
Figura 26. Curva de calibração para o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina	56
Figura 27. Curva de calibração para o enantiômero (-)-(R)-fluoxetina	56

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da análise de etanol na câmara de exposição	39
Tabela 2. Resultado da análise de gasolina na câmara de exposição	40
Tabela 3. Disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-verapamil e (+)- (R)-verapamil nos grupos controle, gasolina e etanol	44
Tabela 4. Disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-norverapamil e (+)-(R)-norverapamil nos grupos controle, gasolina e etanol	45
Tabela 5. Efeito matriz para o ibuprofeno e PI	48
Tabela 6. Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de rato	49
Tabela 7. Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de rato	50
Tabela 8. Disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-ibuprofeno e (- )-(R)-ibuprofeno nos grupos controle, gasolina e etanol	51
Tabela 9. Efeito matriz para a fluoxetina e PI	57
Tabela 10. Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de rato	58
Tabela 11. Estudo de estabilidade do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de rato	59
Tabela 12. Disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-fluoxetina (-)- (R)-fluoxetina nos grupos controle, gasolina e etanol	60

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH-American Conference of Governmental Industrial Hygienists

- ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AUC- Área sob a curva
- AUC<sup>0----</sup>-Área sob a curva do tempo zero ao infinito
- BTEX- Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
- CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CD- Coeficiente de dessorção.
- CE-Eletroforese capilar
- CG- Cromatografia gasosa
- CI- Clearance
- CYP Sistema citocromo P 450
- FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência
- NIOSH National Institute for Ocupational Safety and Health
- NOES-nose only exposure system
- NOR-Norverapamil
- OMS- Organização Mundial da Saúde
- PI- Padrão interno
- **TLV-Threshold Limit Values**
- TLV-STEL- Short Term Exposure Limit
- TLV-TWA- Time Weighted Average
- UNESP- Universidade Estadual Paulista
- UV-Ultravioleta
- 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 OBJETIVOS	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Exposição aos solventes	13
3.1.1 Construção da câmara de exposição	13
3.1.2 Validação do equipamento	20
3.2 Protocolo experimental	20
3.3 Análise dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de rato	23
3.3.1 Reagentes e soluções padrão	24
3.3.2 Equipamentos	24
3.3.3 Curvas de calibração	25
3.3.4 Extração líquido-líquido	25
3.4 Análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos	27
3.4.1 Reagentes e soluções padrão	27
3.4.2 Equipamentos	27
3.4.3 Extração líquido-líquido	28
3.4.4 Validação do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno e plasma de ratos	em 30
3.4.4.1 Determinação do efeito matriz	30
3.4.4.2 Curvas de calibração	30
3.4.4.3 Recuperação	30
3.4.4.4 Limite de quantificação e linearidade	31
3.4.4.5 Precisão e exatidão	31
3.4.4.6 Estabilidade	31

3.5 Análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos	32
3.5.1 Reagentes e soluções padrão	32
3.5.2 Equipamentos	
3.5.3 Extração líquido-líquido	
Fase orgânica	34
3.5.4 Validação do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em pla de ratos	asma 35
3.5.4.1 Determinação do efeito matriz	35
3.5.4.2 Curvas de calibração	35
3.5.4.3 Recuperação	35
3.5.4.4 Limite de quantificação e linearidade	
3.5.4.5 Precisão e exatidão	
3.5.4.6 Estabilidade	
3.6 Análise farmacocinética e análise estatística	37
4 RESULTADOS	
<b>4 RESULTADOS</b> 4.1 Validação da câmara para etanol	<b>38</b> 39
<b>4 RESULTADOS</b> 4.1 Validação da câmara para etanol 4.1.1 Validação da câmara para a gasolina	<b>38</b> 39 40
<ul> <li>4 RESULTADOS</li></ul>	<b>38</b> 39 40 :o41
<ul> <li>4 RESULTADOS</li></ul>	<b>38</b> 
<ul> <li>4 RESULTADOS.</li> <li>4.1 Validação da câmara para etanol.</li> <li>4.1.1 Validação da câmara para a gasolina</li></ul>	<b>38</b> 
<ul> <li>4 RESULTADOS.</li> <li>4.1 Validação da câmara para etanol.</li> <li>4.1.1 Validação da câmara para a gasolina</li></ul>	
<ul> <li>4 RESULTADOS.</li> <li>4.1 Validação da câmara para etanol</li></ul>	38 39 40 :041 46 52 61 61
<ul> <li>4 RESULTADOS</li></ul>	38 39 40 :041 46 52 61 71 73
<ul> <li>4 RESULTADOS</li></ul>	38 39 40 :041 46 52 61 71 73 83

# 1 INTRODUÇÃO

Os fármacos mais frequentemente prescritos são comercializados sob a forma racêmica, embora para alguns deles, já tenha sido demonstrado que os efeitos farmacológicos e ou tóxicos estejam relacionados apenas a um dos enantiômeros. Além disso, é conhecido o fato de que os enantiômeros podem apresentar perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes (HUTT, 2002; MC CONATHY; OWENS, 2003; BROCKS, 2006; LU, 2007).

O controle da variabilidade interindividual na resposta terapêutica representa um dos principais desafios da Farmacologia Clínica. Entre as principais causas relacionadas à variabilidade interindividual incluem-se a indução ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo em função de estados fisiológicos, doenças, polimorfismo genético, interação de fármacos ou ainda da exposição ocupacional a agentes químicos. A indução e a inibição enzimática podem afetar os enantiômeros de um fármaco quiral em diferentes extensões, e são mais expressivas quando os enantiômeros são metabolizados por diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades (KARIN, 1996; KROEMER et al., 1996; MEHVAR; REYNOLDS, 1996; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; HUTZLER; TRACY, 2002).

O sistema enzimático citocromo P450 (CYP) é o principal responsável pela eliminação de fármacos e drogas, poluentes ambientais e outros xenobióticos (BUSBY et al., 1999). O conhecimento das bases moleculares de indução ou inibição do CYP tem obtido grandes progressos. Uma avaliação dos mecanismos de conversão metabólica de 315 diferentes fármacos revelou que 56% deles são dependentes do 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 podendo alterar o metabolismo de um fármaco quiral em diferentes extensões (KROEMER et al., 1996; BUSBY et al., 1999; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001 HUTZLER; TRACY, 2002).

Entre as possibilidades de influência ambiental na modulação da atividade dos CYP está a exposição a agentes químicos, particularmente aos solventes orgânicos. Embora as exposições aos solventes sejam muito freqüentes, pela amplitude do uso destas substâncias, a potencial influência que possam exercer sobre a farmacocinética tem sido pouco investigada.

Neste trabalho foram selecionadas algumas possibilidades de interação entre solventes e fármacos quirais para investigação, representando três grupos

importantes no uso clínico, que são o verapamil, anti-hipertensivo do grupo dos antagonistas de canal de cálcio, o ibuprofeno, do grupo dos antiinflamatórios não esteróides e a fluoxetina, do grupo dos antidepressivos.

O verapamil, [(3,4-dimetoxifeniletil)-metilamino-2-(3,4-dimetoxifenil)-2-isopropil valeronitrila], é um antagonista de canal de cálcio empregado no tratamento da arritmia, angina e hipertensão. É um composto quiral comercializado como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(R) e (-)-(S)-verapamil. O (-)-(S)-verapamil é 10 a 20 vezes mais potente que o antípoda (+)-(R)-verapamil em termos de efeito cronotrópico na condução atrioventricular no homem e em animais de experimentação (JOHNSON; AKERS, 1995; LANKFORD; BAI, 1995; STAGNI; GILLESPIE, 1995; BHATTI; FOSTER, 1997; ASAFUL-ADJAYE; SHIU, 1998; PAGEL et al., 1998).

A farmacocinética do verapamil é enantiosseletiva na administração oral ou intravascular, tanto em homens como em ratos. Em ratos observa-se um acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil (MATEUS et al., 2007). No entanto, as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas observadas no rato são opostas àquelas observadas em estudos clínicos (BHATTI; FOSTER, 1997).

No homem, o verapamil é eliminado essencialmente por metabolismo com formação do norverapamil, resultante da N-desmetilação, e do D-617, resultante da N-desalquilação. Esses dois metabólitos iniciais são ainda metabolizados via CYP dando origem a três outros metabólitos quirais descritos como D-620, PR-22 e PR-25 (também conhecido como D-715), como mostra a Figura 1.



Figura 1. Metabolismo do verapamil (TRACY et al., 1999).

O CYP3A4 é o principal responsável pela N-desalquilação com formação dos enantiômeros (R) e (S)-norverapamil e (R) e (S)-D-617, embora o CYP1A2 e o CYP3A5 também contribuam, em menor proporção, para a formação desses metabólitos. Estudos *in vitro*, empregando microssomos de fígado humano, demonstram que o CYP2C8 é capaz de metabolizar o verapamil com a mesma eficiência que o CYP3A4. No entanto, o envolvimento desse sistema no metabolismo *in vivo* do fármaco é de menor relevância devido a baixa concentração do CYP2C8 no fígado. A formação do metabólito D-620 é mediada pelos CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C8 com predominância na formação do enantiômero (S)-D-620 principalmente pelo CYP3A5 e CYP2C8. Já a formação do PR-22 é mediada pelo CYP2C8 com o metabolismo do (R)-norverapamil formando (R)-PR-22 favorecido sobre o (S)-PR-22. Dessa maneira, qualquer substância capaz de interferir na atividade dessas isoformas, pode alterar o metabolismo do verapamil (TRACY et al., 1999).

Em ratos tratados com dose única de verapamil, o enantiômero (+)-(R)verapamil apresenta maior *clearance*, indicando maior eliminação pré-sistêmica, e volume de distribuição 58% maior do que do (-)-(S)-verapamil, demonstrando enantiosseletividade em todas as fases da farmacocinética (BHATTI; FOSTER, 1997).

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteróidais, comercializado na forma racêmica (ITOH et al., 1997).

A farmacocinética do ibuprofeno é enantiosseletiva na administração oral e intravascular em ratos, e vários estudos indicam que a atividade é maior para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno (ITOH et al., 1997; DAVIES, 1998; TENG et al., 2003). A inversão quiral unidirecional é descrita do enantiômero (-)-(R)-ibuprofeno ao enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno no homem, em ratos e em outras espécies animais (KAISER et al., 1976; KNIHINICKI et al., 1989; RUDY et al., 1991; SATTARI; JAMALI, 1994).

Itoh et al. (1997) relatam a ocorrência de inversão quiral unidirecional do (-)-(R)-ibuprofeno ao (+)-(S)-ibuprofeno em ratos na extensão de 54-58%. Teng et al. (2003) relatam que em ratos tratados com ibuprofeno racêmico por via oral na dose 25 mg/Kg a concentração plasmática máxima é de 9,54 µg/mL para o enantiômero (-)-(R)-ibuprofeno e de 24,1 µg/mL para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, e maiores valores de AUC para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno (97,9 vs 29,9 µg.h.mL<sup>-1</sup>), enquanto a meia-vida de eliminação praticamente não difere entre os enantiômeros (-)-(R)-ibuprofeno e (+)-(S)-ibuprofeno (2,3 vs 2,1 h). Itoh et al. (1997) demonstram que em ratos, após 20 minutos da administração intravenosa de ibuprofeno racêmico, a concentração de (+)-(S)-ibuprofeno é maior do que o (-)-(R)-ibuprofeno. Os autores também reportam que o enantiômero (-)-(R)-ibuprofeno apresenta maior ligação as proteínas plasmáticas e maior *clearance*.

O metabolismo do ibuprofeno em humanos ocorre em duas vias, que são a conjugação com o ácido glicurônico e a via oxidativa. A glicuronidação é favorecida para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno (GLOWKA; KARAZNIEWICZ, 2007). A maior parte da oxidação do ibuprofeno resulta na formação do 2 hidroxi-ibuprofeno e 2 carboxi-ibuprofeno, metabólitos com atividade farmacológica ainda não bem definida. (TAN et al., 2002). O CYP2C9 é responsável pela oxidação do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, enquanto o CYP2C8 está envolvido principalmente no metabolismo do (-)-(R)-ibuprofeno (Fig 2) (GLOWKA; KARAZNIEWICZ, 2007).



Figura 2. Metabolismo do ibuprofeno (GLOWKA; KARAZNIEWICZ, 2007).

A fluoxetina é um fármaco inibidor da recaptação de serotonina empregado como mistura racêmica no tratamento da depressão (WONG et al., 1985;

MARGOLIS et al., 2000). Wong et al. (1985) demonstraram que o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina é mais potente que o enantiômero (-)-(R)-fluoxetina.

A disposição cinética da fluoxetina em ratos tratados por via oral na dose de 10 mg/Kg foi relatada por Hui et al. (2007) como mistura enantiomérica. Os autores reportam meia-vida de eliminação de 2,9 horas, concentração plasmática máxima de 0,26 µg/mL e biodisponibilidade de aproximadamente 90%.

A farmacocinética da fluoxetina é enantiosseletiva em ratos (maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)) (GUO et al., 2002), em ovelhas prenhes (razões enantioméricas (+)-(S)/(-)(R) de AUC de 1,73) (KIM et al., 2003) e em mulheres parturientes (razões enantioméricas (+)-(S)/(-)(R) de concentrações no plasma materno de 2,91) (KIM et al., 2005).

Em microssomos de fígado humano, o CYP2D6 e o CYP2C9 contribuem para a formação do metabólito N-desmetilado (-)-(R)-norfluoxetina, enquanto somente o CYP2D6 é responsável pela formação do (+)-(S)-norfluoxetina (RING et al.,2001).

Os valores de *clearance* da fluoxetina para os enantiômeros (-)-(R)-fluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina diferem entre metabolizadores extensivos e metabolizadores lentos do CYP2D6. Em metabolizadores extensivos do CYP2D6 os valores de *clearance* são respectivamente de 36 e 40 L/h para os enantiômeros (-)-(R)fluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina. Em metabolizadores lentos do CYP2D6 os valores de *clearance* são respectivamente de 3 e 17 L/h para os enantiômeros (-)-(R)-fluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina (FJORDSIDE et al., 1999).

A fluoxetina é descrita como inibidor do CYP2D (LUCAS, 1992; GRAM, 1994). Em estudos com microssomos de fígado humano, o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina é 5-6 vezes mais potente como inibidor do CYP2D do que o correspondente (-)-(R)fluoxetina (STEVENS; WRIGHTON, 1993). Em estudos *in vitro*, a fluoxetina também é inibidora do CYP2C19, CYP3A e CYP2C9 (MARGOLIS et al., 2000).

A importância com que os agentes químicos passaram a integrar a vida do homem pode ser evidenciada pelo seu número, pela diversidade de usos e pela sua onipresença em quase todas as atividades humanas. Atualmente estão recenseadas no *Toxline-ChemIDplus*, base de dados da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos, cerca de 380000 substâncias com as quais se produzem milhões de misturas e formulações (UNITED STATES, 2007).

A partir da década de 50 do século passado, boa parte dos esforços da Toxicologia está voltada para a proposição de padrões de exposição para os agentes químicos, cujo primeiro produto de amplo alcance foi a publicação do livro "*Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*", que contém as bases conceituais da avaliação e do gerenciamento do risco (disponível em http://www.nap.edu/catalog.php?record\_id=366).

Para as exposições ocupacionais, o gerenciamento do risco é feito com base nos Limites de Exposição Ocupacional (LEO), que são padrões para manter a exposição em níveis que possam ser considerados aceitáveis. Os LEO são propostos por agências governamentais ou por organizações internacionais, entre as quais a ACGIH-*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* é referência mundial. Trata-se de uma associação de higienistas de todo o mundo, com sede nos Estados Unidos, que é propositora dos TLVs-*Threshold Limit Values*, sua marca registrada (ACGIH, 2011).

Entre os agentes químicos de grande importância quanto à exposição ocupacional humana, estão os combustíveis automotivos em função dos volumes consumidos e da amplitude e das características da sua distribuição.

O etanol não tem, desde 2009, recomendação de limite de exposição para a média ponderada pelo tempo (TLV-TWA), sendo proposto apenas o limite aplicável às exposições de curta duração (TLV-STEL), que é de 1880 mg/m<sup>3</sup>. Tal limite é considerado suficiente para proteção contra a irritação do trato respiratório superior, que é o efeito agudo mais crítico do etanol.

O etanol é um dos mais peculiares compostos orgânicos contendo oxigênio, dada a combinação de suas propriedades como solvente, germicida, anticongelante, combustível, componente de bebidas, além da versatilidade como intermediário químico para outros produtos (KIRK, 1980). A obtenção industrial de etanol se dá pela síntese a partir do etileno, como subproduto de determinados processos, ou por fermentação do açúcar, celulose ou amido. No caso do Brasil, o principal método para obtenção de etanol baseia-se na fermentação do caldo da cana de açúcar (PEREIRA; ANDRADE, 1998).

O etanol não se acumula no organismo humano, sendo completamente oxidado a CO<sub>2</sub> e água em um breve intervalo de tempo. Menos de 10% do etanol absorvido é excretado inalterado principalmente na urina, no ar exalado e no suor (PEREIRA; ANDRADE, 1998). O metabolismo hepático é responsável pela eliminação de aproximadamente 90% do etanol absorvido, e é dependente da álcool desidrogenase, catalase e do CYP2E1 (BRUCKNER, 2001).

Busby et al. (1999), relatam que o etanol nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 1% em microssomos humanos, inibe de maneira dose dependente a atividade do CYP1A1 (19 a 69%), do CYP2B6 (25 a 80%) e do CYP2C19 (28 a 72%). Klotz ; Ammon (1998), relatam indução do CYP2E1 na presença de etanol.

Hamitouche et al. (2006) observaram que em microssomos hepáticos humanos as isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9\*1, CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4 e CYP4A11 metabolizam o etanol a acetaldeído em quantidades significativas, com valores de Km ao redor de 10 mM. Observaram também que a inibição seletiva dos CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 e CYP1A2 diminuem a oxidação do etanol em 8±1,2%, 7,6±1,6%, 11,9±2,1%, 19,8±1,9% e 16,3±3,9%, respectivamente.

A gasolina ocupa posição de destaque entre as substâncias ambiental e ocupacionalmente importantes, pelas quantidades utilizadas e pelas inúmeras possibilidades de exposição humana. A gasolina é um líquido límpido, volátil e com um odor caracteristico. É um combustível constituído basicamente por hidrocarbonetos aromáticos, olefínicos e saturados e, em menor quantidade, por substâncias contendo enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, entre outros (ACGIH, 2011). Com relação aos compostos aromáticos estão incluídos, principalmente, os compostos denominados BTEX, que compreendem benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno e ainda há um percentual de etanol atualmente adicionado à gasolina (SILVA, 2004; CATALUNÃ; SILVA., 2006).

A gasolina tem propriedades neurotóxica, nefrotóxica e possui potencial carcinogenico (DENNISON et al., 2004). Chu et al. (2005), observaram diminuição no crescimento, nefromegalia, problemas neurológicos e hematológicos em ratos expostos a uma mistura de etanol e gasolina. Ugwoke et al. (2005) observaram diminuição da fertilidade em ratos expostos à gasolina por inalação.

Os efeitos da exposição à gasolina na atividade de enzimas CYP envolvidas no metabolismo de fármacos ainda são poucos conhecidos. A administração interaperitoneal de gasolina a ratos (doses de 1 e 5 mL/kg) resulta em indução do CYP2B (pentoxiresorufina desalquilase) (BRADY et al., 1990). Ida et al. (2000) reportam redução da atividade de enzimas CYP (aminopirina N-desmetilase e anilina-p-hidroxilase) e não alteração das enzimas UGT (bilirrubina glicuronidase) em microssomos de fígado de ratos expostos à gasolina durante 6 min em câmara de exposição nas concentrações de 5-10%.

A exposição aos combustíveis automotivos é caracteristicamente crônica podendo alterar a atividade dos CYP e resultar em modificações importantes na disposição cinética e no metabolismo dos fármacos em uso na clínica.

Estudos anteriores do grupo relatam que a exposição inalatória de ratos ao tolueno (Mateus et al., 2008) ou ao n-hexano (Mateus et al. (2010), em concentrações de 1 ou 2 LEO, resulta em perda da enantiosseletividade na disposição cinética do verapamil administrado por via oral. A exposição inalatória ao metanol na concentração de 800 ppm (2 LEO), resulta em inibição no metabolismo do eutômero (+)-3R,5S-fluvastatina, o qual é metabolizado preferencialmente pelo CYP2C, em ratos tratados com o fármaco racêmico por via oral (CARDOSO, 2008). A exposição inalatória de ratos ao etilbenzeno na concentração de 400 ppm induz de maneira não enantiosseletiva o metabolismo do metoprolol administrado por via oral (GRACIANI, 2009).

Considerando as amplas possibilidades de exposição ocupacional e ambiental aos combustíveis automotivos e considerando os dados anteriores do grupo (Cardoso 2008; Mateus et al., 2008; Graciani 2009; Mateus et al., 2010) que identificam indução ou inibição de enzimas CYP na exposição inalatória a solventes, o presente estudo visa avaliar a influência da exposição inalatória ao etanol combustível ou à gasolina na atividade *in vivo* de enzimas CYP através da administração oral de fluoxetina, ibuprofeno e verapamil, fármacos com metabolismo dependente, respectivamente, do CYP2D, CYP2C e CYP 3A.

# **2 OBJETIVOS**

O objetivo do estudo é investigar em ratos a influência da exposição inalatória ao etanol combustível ou à gasolina na farmacocinética dos enantiômeros do verapamil, ibuprofeno e fluoxetina.

Os objetivos específicos incluem:

1- Desenvolver e validar o método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos com aplicação em estudos de disposição cinética.

2- Desenvolver e validar método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos com aplicação em estudos de disposição cinética.

3- Avaliar a influência da exposição inalatória ao etanol combustível na disposição cinética enantiosseletiva do verapamil, ibuprofeno e fluoxetina em ratos.

4- Avaliar a influência da exposição inalatória à gasolina na disposição cinética enantiosseletiva do verapamil, ibuprofeno e fluoxetina em ratos.

# **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Exposição aos solventes

Os animais foram expostos ao etanol combustível ou gasolina em uma câmara do tipo NOES (Nose Only Exposure System), dotada de quarenta e quatro portas, construída especialmente para o desenvolvimento do projeto.

Foi projetado um dispositivo para a exposição simultânea de até 42 animais, permitindo a execução dos experimentos em período de tempo compatível com o disponível para o projeto.

#### 3.1.1 Construção da câmara de exposição

A Câmara de exposição foi construída por usinagem de peças de aço inoxidável, executada pela Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e será descrita com o auxílio de uma seqüência de fotografias para facilitar a apresentação, de modo a mostrar cada componente do sistema, e sua montagem progressiva, formando o equipamento e seus acessórios.

A base é constituída por um disco com uma abertura central e duas ranhuras concêntricas onde se apoiam os anéis que formam a câmara interna e externa do equipamento.



**Figura 3.** Base da câmara em que se vê o orifício central (1) para entrada da atmosfera experimental e duas ranhuras concêntricas (2 e 3) onde se encaixam os anéis que formarão a câmara interna e externa.

A câmara interna recebe a atmosfera experimental, que ingressa pelo orifício central, em sentido ascendente, e a distribui através de trompetes que dela partem radialmente em direção às portas de exposição afixadas no anel externo.



**Figura 4.** Câmara interna, onde se conectam os trompetes de distribuição da atmosfera em estudo para as portas de exposição. A) câmara interna, B) trompetes, C) câmara interna com um trompete conectado, em sua posição sobre a base do dispositivo.



**Figura 5.** Montagem do anel externo e trompetes A) Vista do anel externo, com as portas de exposição, sobre a base B) montagem dos trompetes que distribuem a atmosfera para as portas de exposição C) vista interna das câmaras concêntricas D) montagem completa dos componentes internos.

O anel externo, com sua tampa, forma a câmara externa que faz a exaustão da atmosfera não inalada pelos animais e do ar que exalam, através de aspiração por uma abertura central na tampa da câmara do equipamento.



Figura 6. Montagem da câmara externa. A) detalhe da vedação B) tampa externa C) dispositivo fechado.

A cada porta de exposição é acoplado um contentor que posiciona o animal para que seja exposto apenas pelo nariz. O contentor cilíndrico tem a ponta em aço inox, com um furo central para exposição do nariz e "o'rings" para acoplamento na câmara. O corpo do contentor é de acrílico, assim como a tampa posterior deslizante, para permitir ajuste ao tamanho do animal, como mostra a figura 7.



**Figura 7.** Contentor e seu acoplamento ao sistema. A) corpo do contentor em que se vê o acoplamento metálico, uma ranhura superior para ajustar a tampa posterior ao tamanho do animal e permitir acesso ao seu dorso, e uma abertura inferior para escoar fezes e urina durante a exposição. B) detalhe do acoplamento do contentor à câmara, C) detalhe da tampa de acrílico com a trava para fixar o seu posicionamento e uma ranhura na parte oposta para exteriorizar a cauda do animal permitindo a termorregulação e evitando a sua rotação dentro do contentor. D) Detalhe da parte do contentor que se acopla à câmara. E) detalhe da porta de exposição.

A geração da atmosfera experimental é feita em fluxo contínuo através de um dispositivo também construído artesanalmente. Um fluxo de ar comprimido é dividido em duas correntes. A primeira vai para um borbulhador com água destilada para restaurar-lhe a umidade e a segunda recebe um fluxo controlado do solvente, sendo a seguir recombinados e turbilhonados por estreitamento do tubo que conduz a mistura para ingressar na câmara de exposição. O estreitamento é feito de modo a produzir número de Reynolds superior a 2500, transformando o fluxo laminar em turbilhonado.



Na figura 8 apresentamos o sistema de geração de atmosferas e uma breve descrição de seus componentes.

**Figura 8.** Dispositivo gerador da atmosfera experimental. **A)** O ar comprimido entra pelo rotâmetro principal (1) e é dividido para os rotâmetros secundários (2) e (3) que dirigem parte do fluxo principal para o borbulhador umidificador do ar (4) e parte para o dispositivo onde recebe o solvente (6), o qual é bombeado continuamente por um bomba de infusão (5), usando uma seringa "gas-tight" (7). B) detalhe da tampa do dispositivo gerador da atmosfera: (1) capilar que traz o solvente, (2) entrada de ar seco, (3) entrada de ar úmido e (4) saída da mistura. C) entrada na câmara de exposição (1) e, no detalhe circundado em vermelho, o estreitamento do tubo para forçar o turbilhonamento e homogeneizar a mistura solvente -ar.

Na figura a seguir (figura 9) pode ser observada uma vista superior da câmara completamente montada. A peça no centro da tampa é a saída para exaustão, a qual é controlada por uma bomba aspirante de vazão programável em função do fluxo que ingressa, de modo a evitar pressões positivas ou negativas no interior do sistema. A câmara possui 44 portas e capacidade para até 42 animais, considerando a reserva de, no mínimo, duas portas para monitoramento da atmosfera experimental.



Figura 9. Câmara para exposição apenas pelo nariz.

Na figura 10, apresentamos uma fotografia do equipamento em sua locação, em uma sala de aproximadamente 14 m<sup>2</sup>, contígua ao biotério da disciplina de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. A sala é dotada de climatização própria, permitindo condições adequadas para que os animais façam a termorregulação.



Figura 10. Locação da câmara na sala do biotério da disciplina de Toxicologia.

#### 3.1.2 Validação do equipamento

As amostras da atmosfera experimental foram coletadas em duas portas diametralmente opostas para cada um dos dois planos da câmara (superior e inferior) em que se acoplam os contentores para os animais, de modo a possibilitar a identificação da eventual formação de gradientes de concentração, tanto no plano horizontal quanto no vertical. A validação do equipamento foi feita pela verificação das flutuações de concentração da atmosfera experimental entre as portas de exposição (homogeneidade) e ao longo do tempo, durante um ciclo de exposição de seis horas (estabilidade). Foram realizadas amostragens de 15 minutos, na primeira, terceira e sexta horas de funcionamento da câmara.

As amostras foram coletadas em tubos de carvão ativo 100X50 mg, usando bombas de amostragem microprocessadas modelo 224-PCXR7 (SKC<sup>®</sup> Inc, Eighty Four, PA, USA, ref. 226-01, lote 2000).

O etanol combustível foi analisado após dessorção em dissulfeto de carbono (Merck, Rio de Janeiro) contendo n-butanol (1µL/mL) como padrão interno e injeção em cromatógrafo a gás CG500 equipado com coluna Carbowax 20M sobre Chromossorb WHP 1,8 m, (Instrumentos Científicos CG Ltda), e detector por ionização em chama. O equipamento operou com forno de colunas em modo isotérmico a 120°C, vaporizador a 200°C e detector a 220°C.

As análises de gasolina foram realizadas após dessorção em dissulfeto de carbono (Merck, Rio de Janeiro), contendo metanol 2 µL/mL como padrão interno, e injeção em cromatógrafo a gás CG500 equipado com coluna SP2100 a 20% + Carbowax 1500 a 0,1% sobre Supelcoport (Intechrom Ltda., São Paulo) e detector por ionização em chama, nas seguintes condições: coluna a 50° C por 5min., aquecimento a 20°C/min. até 220°C, mantidos por 5 min., vaporizador a 220°C e detector a 240°C.

#### 3.2 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP Protocolo-CEP/FCF/CAr n<sup>0</sup> 39/2008 Anexo 1).

Foram utilizados ratos machos, Wistar, de 250  $\pm$  10 g, provenientes do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Antes dos experimentos, os animais permaneceram durante 3 dias no Biotério Institucional em uma sala com controle de temperatura 20 ± 1°C e controle de umidade de 60 ± 20%, e tiveram livre acesso a ração e água. Os animais foram divididos em 9 grupos: controle verapamil, controle ibuprofeno, controle fluoxetina, etanol combustível+ verapamil, etanol combustível+ ibuprofeno, etanol combustível+ fluoxetina, gasolina+ verapamil, gasolina+ ibuprofeno e gasolina+fluoxetina.

 Exposição controle: os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 6 semanas, expostos apenas ao ar.

 Exposição ao etanol combustível: os animais foram expostos por via inalatória ao vapor do etanol combustível na concentração de 3.768,5 mg/m<sup>3</sup> (equivalente a 2 vezes o LEO), por 6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 6 semanas.

A definição da concentração de exposição ao etanol combustível considerou a informação de que os seus efeitos a longo prazo em animais (cirrose hepática, alterações da fertilidade e do desenvolvimento da prole), em numerosos estudos, ocorrem em exposição a concentrações superiores a 10.000 ppm (18,8 g/m<sup>3</sup>). Ainda, a concentração de etanol no ar que provoca irritação respiratória em camundongos, é estimada em 13.000 ppm (ACGIH, 2011).

 Exposição ao vapor de gasolina: os animais foram expostos por via inalatória ao vapor de gasolina, na concentração de 1780 mg/m<sup>3</sup> (equivalente a 2 vezes o LEO), por 6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 6 semanas.

A definição da concentração de gasolina a ser inalada considerou o TLV-STEL de 1480 mg/m<sup>3</sup>, adotado como capaz de minimizar irritação ocular, de mucosas e a depressão do sistema nervoso central em humanos. Também, os efeitos da exposição crônica de ratos ao vapor de gasolina ocorrem em concentrações e tempos de exposição bastante superiores aos empregados no presente estudo (ACGIH, 2001). Na concentração utilizada não foram observados sinais de irritação, como coriza e hiperemia ocular nos animais expostos. - Grupo controle verapamil: Antes da última exposição ao ar, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e receberam cloridrato de verapamil racêmico dissolvido em água na dose de 10 mg/Kg, por gavagem. As amostras de sangue foram colhidas nos tempos 0, 20 e 40 minutos e 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 e 6 horas (MATEUS et al., 2007). De cada animal, foram coletadas três amostras em diferentes tempos (n=8 para cada tempo) através da excisão de cerca de 0,3 mm da porção distal da cauda, após vasodilatação localizada por aquecimento a 42°C. Os plasmas obtidos, após centrifugação, foram armazenados a -20 °C até a análise.

 Grupo exposto ao etanol combustível + verapamil: Antes da última exposição ao etanol combustível, os animais foram tratados com cloridrato de verapamil racêmico e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

 Grupo exposto ao vapor de gasolina + verapamil: Antes da última exposição ao vapor de gasolina, os animais foram tratados com cloridrato de verapamil racêmico e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

- **Grupo controle ibuprofeno**: Antes da última de exposição ao ar os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e receberam ibuprofeno racêmico dissolvido em polietilenoglicol/solução fisiológica na proporção de 70:30 na dose de 25 mg/Kg, por gavagem. As mostras de sangue foram colhidas nos tempos 0, 15 e 30 minutos e 1; 2; 4; 6, 7 e 8 horas (TENG et al., 2003; NEWA et al., 2008). De cada animal, foram coletadas três amostras em diferentes tempos (n=8 para cada tempo) através da excisão de cerca de 0,3 mm da porção distal da cauda, após vasodilatação localizada por aquecimento a 42°C. Os plasmas obtidos, após centrifugação, foram armazenados a – 20 °C até a análise.

 Grupo exposto ao etanol combustível + ibuprofeno: Antes da última exposição ao etanol, os animais foram tratados com iburofeno racêmico e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.
Grupo exposto ao vapor de gasolina + ibuprofeno: Antes da última exposição ao vapor de gasolina, os animais foram tratados com iburofeno racêmico e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

- Grupo controle fluoxetina: Antes da última de exposição ao ar os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e receberam fluoxetina racêmica dissolvida em polietilenoglicol/solução fisiológica na proporção de 70:30 na dose de 10 mg/Kg, por gavagem. Amostras de sangue foram colhidas nos tempos 15 e 30 minutos e 1; 2; 3; 4; 6 e 12 horas (HUI et al., 2007; UPRETI et al., 2007). De cada animal, foram coletadas três amostras em diferentes tempos (n=8 para cada tempo) através da excisão de cerca de 0,3 mm da porção distal da cauda, após vasodilatação localizada por aquecimento a 42°C. Os plasmas obtidos, após centrifugação, foram armazenados a – 20 °C até a análise.

- Grupo exposto ao etanol combustível + fluoxetina: Antes da última exposição ao etanol combustível, os animais foram tratados com fluoxetina racêmica e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

 Grupo exposto ao vapor de gasolina + fluoxetina: Antes da última exposição ao vapor de gasolina, os animais foram tratados com fluoxetina racêmica e as amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o protocolo descrito para o grupo controle.

# 3.3 Análise dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de rato

A análise dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de ratos foi realizada de acordo com o método desenvolvido e validado em estudo anterior do grupo (MATEUS et al., 2007). O método emprega 100 μL de plasma, extração líquido-líquido, separação dos enantiômeros na coluna de fase quiral Chiralpak AD<sup>®</sup> e análise por LC-MS-MS.

#### 3.3.1 Reagentes e soluções padrão

Foram utilizados os solventes grau HPLC hexano, isopropanol e etanol (Tedia Way, Fairfield, Estados Unidos), acetato de amônio (J T Baker, Xalostoc, México), dietilamina e hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A solução estoque de cloridrato de verapamil e norverapamil racêmico (99%, Sigma Aldrich, St Louis, Estados Unidos) foi preparada na concentração de 0,1 mg de cada enantiômero/mL de metanol e posteriormente diluída nas seguintes concentrações 4; 20; 40; 100; 200; 400; 800 e 2000 ng de cada enantiômero/mL de metanol. A paroxetina empregada como padrão interno (PI) foi gentilmente cedida pelo laboratório Eurofarma (São Paulo, SP, Brasil) e foi preparada na concentração de 1 mg/mL de metanol. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C.

#### 3.3.2 Equipamentos

O sistema HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) foi constituído por bomba modelo LC-10AS e detector por espectrometria de massas Quattro Micro (Micromass, Manchester, Reino Unido) operando com energia capilar de 3 kV, energia do cone de 45 V, temperatura da fonte de 100° C e temperatura de dessolvatação de 200 °C. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador na vazão de 350 L.h<sup>-1</sup>. O argônio foi usado como gás de colisão na pressão aproximada de 2,05 x 10<sup>-3</sup> mbar. Para registrar e integrar os picos foi empregado o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

A separação cromatográfica do verapamil e do norverapamil foi obtida na coluna Chiralpak<sup>®</sup>AD (Daicel Chemical Industries LTD., Exton, EUA) com partículas de 10 μm, (250 x 4 mm) com pré coluna CN Lichrospher® (Merck, Darmstadt, Alemanha), partículas de 5μm, (4 x 4 mm). A coluna foi mantida a 25°C em forno Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo CTO-10 AS VP. A fase móvel foi constituída por hexano, isopropanol, etanol e dietilamina (88:6:6:0.1 v/v/v/v) na vazão de 1,35 mL/min e infusão pós coluna composta de etanol: solução de acetato de amônio 20mM (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): 330>192 para a paroxetina, 441>165 para os enantiômeros do norverapamil e 455>165 para os enantiômeros do verapamil.

#### 3.3.3 Curvas de calibração

Amostras de plasma branco (100  $\mu$ L) fortificadas com 25  $\mu$ L de cada uma das soluções padrão (4; 20; 40; 100; 200; 400; 800 e 2000 ng de cada enantiômero/mL de metanol) foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica abaixo descritos. As razões de altura padrão/PI foram plotadas em função das concentrações de verapamil e norverapamil em plasma (1-200 ng de cada enantiômero/mL de plasma).

# 3.3.4 Extração líquido-líquido

Alíquotas de 100 µL de plasma foram fortificadas com 25 µL de solução de PI, 25 µL de solução de NaOH 2M e 2 mL de hexano. Após a agitação durante 2 minutos em agitador tipo vortex e centrifugação por 10 minutos a 1800 rpm, as fases orgânicas (1,5 mL) foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas até a secura, em sistema de evaporação à vacuo (modelo RVC 2-25 CD plus, Martin Christ, Germany) е os resíduos retomados em 200 μL de fase móvel (hexano:isopropanol:etanol:dietilamina), dos quais 130 µL foram submetidos à análise cromatográfica.



Figura 11. Procedimento de extração líquido-líquido do verapamil e norverapamil em plasma de ratos.

#### 3.4 Análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos

#### 3.4.1 Reagentes e soluções padrão

Foram utilizados os solventes grau HPLC acetonitrila e hexano (Tedia Way, Fairfield, Estados Unidos), metanol (Sigma Aldrich, Alemanha), éter di-isopropílico (Acros Organics, New Jersey, Estados Unidos), acetato de amônio e ácido clorídrico (J T Baker, Xalostoc, México).

A solução estoque de ibuprofeno racêmico (98%, Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foi preparada na concentração de 400 µg de cada enantiômero/mL de metanol e posteriormente diluída nas seguintes concentrações 0,2; 0,4; 0,8; 2; 4; 8; 16; 40; 80 e 200 µg de cada enantiômero/mL de metanol. A solução de fenoprofeno (USP, Rockville, Estados Unidos) empregada como padrão interno (PI) foi preparada na concentração de 32 µg/mL de metanol. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C.

#### 3.4.2 Equipamentos

O sistema HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) foi constituído por bomba modelo LC-10AS e detector por espectrometria de massas Quattro Micro (Micromass, Manchester, Reino Unido) operando com energia capilar de 3 kV, energia do cone de 20 V, temperatura da fonte de 120° C e temperatura de dessolvatação de 200 °C. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador na vazão de 350 L.h<sup>-1</sup>. O argônio foi usado como gás de colisão na pressão aproximada de 2,03 x 10<sup>-3</sup> mbar. Para registrar e integrar os picos foi empregado o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

A separação cromatográfica foi obtida na coluna Chirex<sup>®</sup> (Phenomenex, Torrence, Estados Unidos), 250 x 4,6 mm com pré coluna C8 Lichrospher® 100 (Merck, Darmstadt, Alemanha), 4 x 4 mm e partículas de 5 μm. A coluna foi mantida a 25°C em forno Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo CTO-10 AS VP. A fase móvel foi constituída por acetato de amônio 0,01 M em metanol na vazão de 1,1 mL/min. Foi empregado o interfaceamento por *electrospray*. O modo de ionização das moléculas foi negativo com o equipamento operando em modo de monitorização seletiva de íons. Desta forma foram analisadas as seguintes transições massa/carga (m/z): 205>161 para o ibuprofeno e 240>197 para o fenoprofeno.

# 3.4.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi realizada utilizando-se 200  $\mu$ L de plasma, 25  $\mu$ L da solução de fenoprofeno (PI), 100  $\mu$ L de HCI 1M e 1 mL de acetonitrila. Após a agitação durante 2 minutos em agitador tipo *vortex* e centrifugação durante 5 min a 1800 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos com rolhas esmerilhadas e extraídos com 5 mL de hexano:éter di-isopropílico (50:50, v/v). Após 30 minutos de extração em agitador horizontal (± 250 ciclos/min) e centrifugação durante 10 min a 1800 rpm, os extratos orgânicos foram transferidos para tubos cônicos, concentrados até a secura em sistema de evaporação à vacuo (modelo RVC 2-25 CD plus, Martin Christ, Germany) e os resíduos retomados em 100  $\mu$ L de fase móvel (acetato de amônio 0,01M em metanol), dos quais 60  $\mu$ L foram submetidos à análise cromatográfica.



Figura 12. Procedimento de extração líquido-líquido do ibuprofeno em plasma de ratos.

# 3.4.4 Validação do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos

O método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos foi validado com base na Resolução ANVISA Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, RE n<sup>0</sup> 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). O método foi validado com base nas concentrações plasmáticas compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética em ratos.

# 3.4.4.1 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das alturas dos picos do ibuprofeno e do fenoprofeno (PI) injetados diretamente na fase móvel, com as alturas dos picos do ibuprofeno e do fenoprofeno (PI) adicionados a extratos de plasma (processo de extração descrito no item 3.4.3) oriundos de um *pool* de plasma de rato.

#### 3.4.4.2 Curvas de calibração

Amostras de plasma branco (200 µL) fortificadas com 25 µL de cada uma das soluções padrão (0,2; 0,4; 0,8; 2; 4; 8; 16; 40; 80; 200 e 400 µg de cada enantiômero/mL de metanol) foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica acima descritos. As razões de altura padrão/PI foram plotadas em função das concentrações de ibuprofeno em plasma (0,025-50 µg de cada enantiômero/mL de plasma) para o cálculo das equações de regressão linear e dos coeficientes de determinação.

#### 3.4.4.3 Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração amostras enriquecidas com soluções padrão de ibuprofeno (0,06; 20 e 40 µg de cada enantiômero/mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.4.3. As concentrações de ibuprofeno e PI dessas amostras foram calculadas através da comparação direta com as alturas dos picos de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco.

#### 3.4.4.4 Limite de quantificação e linearidade

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração analisada com coeficiente de variação inferior a 20% e com porcentagem de inexatidão inferior a 15%. Assim, foram analisadas replicatas (n=10) de amostras de ibuprofeno em plasma de rato na concentração de 0,025µg de cada enantiômero/mL de plasma.

A linearidade foi avaliada com amostras de plasma branco enriquecidas com ibuprofeno no intervalo de concentrações 0,025-50 µg de cada enantiômero/mL de plasma. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática analisada que mostrou relação linear com a resposta do detector.

# 3.4.4.5 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e inter-ensaios. As soluções de ibuprofeno foram preparadas nas concentrações de 0,06; 20 e 40 µg de cada enantiômero/mL de plasma. Essas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-ensaio foram analisadas 5 alíquotas dessas soluções em um mesmo dia, ou seja, através de uma única curva de calibração.

Na avaliação da precisão e da exatidão inter-ensaios foram analisadas 5 alíquotas das soluções de ibuprofeno durante 5 diferentes corridas em dias consecutivos.

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

# 3.4.4.6 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta. Para a avaliação da estabilidade do ibuprofeno foram preparadas amostras enriquecidas com concentrações baixa e alta (0,06 e 40 µg de cada enantiômero/mL de plasma).

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 h, a seguir foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 5°C durante 24 h antes da injeção no sistema cromatográfico. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas de plasma foram mantidas na bancada do laboratório em temperatura ambiente durante 4 h. Para a avaliação da estabilidade de longa duração as amostras de plasma enriquecidas com ibuprofeno foram mantidas em freezer a - 20°C durante 12 meses.

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

# 3.5 Análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos

# 3.5.1 Reagentes e soluções padrão

Os solventes utilizados grau HPLC foram etanol (Tedia, Way/Fairfield, Estados Unidos), hexano (Acros Organics, New Jersey, Estados Unidos), álcool isoamílico (Fisher Scientific) e metanol (Merk, Darmstadt, Alemanha). Foram ainda utilizados acetato de amônio e hidróxido de sódio (J T Baker, Xalostoc, México).

Toda água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Waters).

A solução estoque de fluoxetina racêmica (TRC, Toronto, Canadá) foi preparada na concentração de 1 mg de cada enantiômero/ml de metanol e posteriormente diluída nas seguintes concentrações 4; 8; 40; 80; 200; 400; 800; 2000 e 4000 ng de cada enantiômero/mL de metanol. A solução de metoprolol (tartarato de metoprolol 97%, Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) usado como padrão interno foi preparado na concentração de 20 µg/mL de metanol e posteriormente diluída para a concentração de 0,4 µg/mL. Todas as soluções padrão foram armazenadas a -20°C.

#### 3.5.2 Equipamentos

O sistema HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) foi constituído por bomba modelo LC-10AS e detector por espectrometria de massas Quattro Micro (Micromass, Manchester, Reino Unido) operando com energia capilar de 3 kV, energia do cone de 30 V, temperatura da fonte de 120° C e temperatura de dessolvatação de 200 °C. O nitrogênio foi empregado como gás nebulizador na vazão de 350 L.h<sup>-1</sup>. O argônio foi usado como gás de colisão na pressão aproximada de 2,05 x 10<sup>-3</sup> mbar. Para registrar e integrar os picos foi empregado o programa MassLynx versão 3,5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

A separação cromatográfica foi obtida na coluna Astec Chirobiotic<sup>®</sup> V, 25 cm x 4,6 mm (Supelco, Torrence, Estados Unidos), com pré-coluna CN Lichospher<sup>®</sup> 100 (Merck, Darmstadt, Alemanha) 4x4 mm e partículas de 5 μm. A coluna foi mantida em forno Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo CTO-10 AS VP, à temperatura de 23°C. A fase móvel foi constituída por etanol: acetato de amônio 15mM (85:15%v/v) na vazão de 1 mL/min. 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): 310>44 para a fluoxetina e 268>116 para o metoprolol.

#### 3.5.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi realizada em tubos plásticos utilizando-se 200  $\mu$ L de plasma, 25  $\mu$ L de solução de metoprolol (0,4  $\mu$ g/mL; padrão interno), 200  $\mu$ L de NaOH 2 M e 4 mL de hexano: álcool isoamílico (99:1; v/v). Após 30 minutos de agitação horizontal (± 250 ciclos/min) e centrifugação durante 10 min a 2000g, os extratos orgânicos foram transferidos para tubos cônicos, concentrados até a secura em sistema de evaporação à vacuo (modelo RVC 2-25 CD plus, Martin Christ, Germany) e os resíduos retomados em 150  $\mu$ L de etanol: acetato de amônio 15 mM (85:15 v/v), dos quais 120  $\mu$ L foram submetidos à análise cromatográfica.



Figura 13. Procedimento de extração líquido-líquido da fluoxetina em plasma de rato.

# 3.5.4 Validação do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos

O método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos foi validado com base na Resolução ANVISA Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, RE n<sup>0</sup> 899 de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003). O método foi validado com base nas concentrações plasmáticas compatíveis com a aplicação em estudos de farmacocinética em ratos.

# 3.5.4.1 Determinação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das alturas dos picos da fluoxetina e do metoprolol (PI) injetados diretamente na fase móvel, com as alturas dos picos da fluoxetina e do metoprolol (PI) adicionados a extratos de plasma branco (processo de extração descrito no item 3.5.3) oriundos de um *pool* de plasma de ratos Wistar.

#### 3.5.4.2 Curvas de calibração

Amostras de plasma branco (200 µL) fortificadas com 25 µL de cada uma das soluções padrão (4; 8; 40; 80; 200; 400; 800; 2000 e 4000 ng de cada enantiômero/mL de metanol) foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica acima descrita. As razões de altura padrão/PI foram plotadas em função das concentrações para o cálculo das equações de regressão linear e dos coeficientes de determinação (0,5-500 ng de cada enantiômero da fluoxetina /mL de plasma).

#### 3.5.4.3 Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração amostras enriquecidas com soluções padrão de fluoxetina (1, 200 e 400 ng de cada enantiômero/mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.5.3. As concentrações de fluoxetina e PI dessas amostras foram calculadas através da comparação direta com as alturas dos picos de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco.

#### 3.5.4.4 Limite de quantificação e linearidade

O limite de quantificação foi definido como a menor concentração analisada com coeficiente de variação inferior a 20% e com porcentagem de inexatidão inferior a 20%. Assim, foram analisadas replicatas (n=10) de amostras de fluoxetina em plasma de rato na concentração de 0,5 ng de cada enantiômero/mL de plasma.

A linearidade foi avaliada com amostras de plasma branco enriquecidas com fluoxetina no intervalo de concentrações 0,5-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma. O método foi considerado linear até a maior concentração plasmática analisada que mostrou relação linear com a resposta do detector.

#### 3.5.4.5 Precisão e exatidão

A repetibilidade e a exatidão dos métodos foram avaliadas através de estudos intra e inter-ensaios. As soluções de fluoxetina foram preparadas nas concentrações de 1, 200 e 400 ng de cada enantiômero/mL de plasma. Essas soluções foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até a análise.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-ensaio foram analisadas 5 alíquotas dessas soluções em um mesmo dia, ou seja, através de uma única curva de calibração.

Na avaliação da precisão e da exatidão inter-ensaios foram analisadas 5 alíquotas das soluções de fluoxetina durante 5 diferentes corridas em dias consecutivos.

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

# 3.5.4.6 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de ciclos de congelamento e descongelamento, pós-processamento e estabilidade de curta. Para a avaliação da estabilidade da fluoxetina foram preparadas amostras enriquecidas com concentrações baixa e alta (1 e 400 ng de cada enantiômero/mL de plasma).

Para verificar a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras enriquecidas foram congeladas a -20°C por pelo menos 24 h, a seguir

foram descongeladas e congeladas novamente por 24 h, repetindo-se esse processo até o terceiro ciclo de congelamento quando foram extraídas e analisadas. Para a avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras extraídas foram mantidas no auto-injetor a 5<sup>o</sup>C durante 24 h antes da injeção no sistema cromatográfico. Para a avaliação da estabilidade de curta duração as amostras enriquecidas de plasma foram mantidas na bancada do laboratório em temperatura ambiente durante 4 h.

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

# 3.6 Análise farmacocinética e análise estatística

As áreas sob as curvas de concentração plasmática em função do tempo (AUC) foram calculadas diretamente no intervalo de zero a infinito com base na Quadratura de Gauss-Laguerre, a qual estima diretamente a área evitando a extrapolação ao infinito e as dificuldades decorrentes da estimação da constante de eliminação. As concentrações correspondentes aos tempos não coincidentes com os nós da quadratura foram estimadas por interpolação polinomial (AMISAKI, 2001).

O clearance aparente (Cl/f) foi calculado com base na equação Cl/f=dose/AUC (RITSCHEL; KEARNS, 1999).

A comparação dos valores de AUC e Cl/f obtidos para cada fármaco (verapamil, ibuprofeno e fluoxetina) e para cada Grupo exposto aos combustíveis automotivos (gasolina e etanol) e seu respectivo Controle, foi realizada através da construção de Intervalos de Confiança, ao nível de 95%, para a diferença entre os respectivos valores de AUC e Cl/f. As variâncias foram estimadas considerando que a amostragem é esparsa, isto é, as amostras podem ser colhidas de um mesmo animal, porém não em todos os tempos (CAPELA et.al, 2012).

# **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Validação da câmara para etanol

A tabela 1 mostra os resultados individuais obtidos nas amostragens realizadas, para a concentração pretendida de 3768,5 mg/m<sup>3</sup>, equivalentes a duas vezes o Limite de Exposição Ocupacional para o etanol. Considerando todas as amostras, as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação (%) foram 3749,63 ± 85,34 mg/m<sup>3</sup>, CV=2,28 para as portas do plano inferior e de 3748,83 ± 123,34 mg/m<sup>3</sup>, CV= 3,29 para as portas do plano superior. As médias e desvios-padrão geométricos foram 3748,79x/÷1,0231 mg/m<sup>3</sup> para as portas do plano superior.

A comparação da média obtida com as amostras coletadas no plano superior com aquela obtida para o plano inferior resultou t= -0,0973; p=0,9263, indicando que não se forma gradiente de concentração no plano vertical da câmara.

	40 minutos		200 minutos		330 minutos	
Plano coleta	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior
Amostra 1 (mg/m³)	3694,80	3864,60	3623,10	3514,70	3720,00	3792,00
Amostra 2 (mg/m³)	3797,30	3785,30	3809,40	3818,10	3853,00	3748,30
Média (mg/m³)	3785,44		3691,36		377	78,33
Desvio-padrão	69,80		148,16		50,17	
CV (%)	1,80		4,01		1,32	

**Tabela 1**. Resultados da análise das concentrações de etanol nas portas da câmara de exposição (mg/m<sup>3</sup>).

A comparação entre as médias das concentrações de etanol nas amostras coletadas aos 40, 200 e 330 minutos resultaram em t= 1,067; p=0,364 para 40 *v*s 200 minutos, t=0,2464; p=0,8212 para 40 *v*s 330 minutos e t=1,202; p= 0,3155 para 200 *v*s 330 minutos, apontando que as diferenças entre as médias não são significativas.

# 4.1.1 Validação da câmara para a gasolina

A tabela 2 mostra os resultados individuais obtidos nas amostragens realizadas, para a concentração pretendida de 1780 mg/m<sup>3</sup>, equivalentes a duas vezes o Limite de Exposição Ocupacional para a gasolina. Considerando todas as amostras, as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação (%) foram 1764,95  $\pm$  164,43 mg/m<sup>3</sup>, CV=9,32 para as portas do plano inferior e de 1738,24  $\pm$  157,60 mg/m<sup>3</sup>, CV= 9,07 para as portas do plano superior. As médias e desvios-padrão geométricos foram 1758,57x/÷1,1 mg/m<sup>3</sup> para as portas do plano inferior da câmara e 1732,4x/÷1,09 mg/m<sup>3</sup> para as portas do plano superior.

A comparação da média obtida com as amostras coletadas no plano superior com aquela obtida para o plano inferior resultou t= -0,97; p=0,38, indicando que não se forma gradiente de concentração no plano vertical da câmara.

	40 minutos		200 minutos		330 minutos	
Plano coleta	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior
Amostra 1	1948,86	1965,43	1608,99	1691,66	1756,86	1697,80
Amostra 2	1575,27	1889,55	1878.05	1913,94	1659,44	1889,55
Média (mg/m³)	1844,78		173	3,16	175	0,91
Desvio-padrão	182,6		146,53		100,74	
CV (%)	9,9		8,2	26	5,	75

**Tabela 2.** Resultados da análise das concentrações de gasolina nas portas da câmara de exposição (mg/m<sup>3</sup>).

A comparação entre as médias das concentrações de gasolina nas amostras coletadas aos 40, 200 e 330 minutos resultaram em t= 0,46; p=0,68 para 40 *vs* 200 minutos, t=0,69; p=0,54 para 40 *vs* 330 minutos e t=0,29; p= 0,38 para 200 *vs* 330 minutos, apontando que as diferenças entre médias não são significativas.

#### 4.2 Análise dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de rato

As Figuras 14 e 15 mostram respectivamente as curvas de calibração para os enantiômeros (-)-(S)-verapamil e (+)-(R)-verapamil em plasma de ratos.



Figura 14. Curva de calibração para o enantiômero (-)-(S)-verapamil no intervalo de concentrações plasmáticas de 1- 200 ng/mL.



**Figura 15.** Curva de calibração para o enantiômero (+)-(R)-verapamil no intervalo de concentrações plasmáticas de 1- 200 ng/mL.

As Figuras 16 e 17 mostram respectivamente as curvas de calibração para os enantiômeros do norverapamil (-)-(S)-norverapamil e (+)-(R)-norverapamil em plasma de ratos.



**Figura 16.** Curva de calibração para o enantiômero (-)-(S)-norverapamil no intervalo de concentrações plasmáticas de 1- 200 ng/mL.



Figura 17. Curva de calibração para o enantiômero (+)-(R)-norverapamil no intervalo de concentrações plasmáticas de 1- 200 ng/mL.

A Figura 18 apresenta os cromatogramas que mostram a separação dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de ratos.



**Figura 18.** Análise dos enantiômeros do verapamil e norverapamil em plasma de ratos. Cromatogramas referentes a (A) amostra de plasma de animal tratado com verapamil racêmico (B) amostra de plasma fortificada com verapamil e (C) amostra de plasma branco. Pico (1) (-)-(S)-verapamil, (2) (+)-(R)-verapamil, (3) paroxetina (PI), (4) (-)-(S)-norverapamil, (5) (+)-(R)-norverapamil.

A disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-verapamil e (+)-(R)-verapamil nos **grupos controle, etanol e gasolina** tratados com verapamil racêmico está apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-verapamil e (+)-(R)-verapamil nos **grupos controle, gasolina e etanol** (n=8 para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média ± desvio padrão.

	AUC <sup>0-∞</sup> (ng.h.mL <sup>-1</sup> )	Cl/f(L.h⁻¹.Kg⁻¹)	AUC <sub>(-)</sub> /AUC <sub>(+)</sub>
Grupo controle			
(-)-(S)-verapamil	333,95 ±54,39	14,97 ± 2,44	3,64
(+)-(R)-verapamil	91,84 ± 23,86	54,44 ± 14,14	
Grupo gasolina			
(-)-(S)-verapamil	331,05 ± 39,56	15,10 ± 1,80	4,10
(+)-(R)-verapamil	80,66 ± 10,62	61,99 ± 8,16	
Grupo etanol			
(-)-(S)-verapamil	$122,81 \pm 24,54^{*}$	$40,71 \pm 8,14^{*}$	3,64
(+)-(R)-verapamil	$33,77 \pm 8,04^{*}$	$148,05 \pm 35,27^{*}$	

\* p<0,05 (controle *vs* gasolina e controle *vs* etanol)

A disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-norverapamil e (+)-(R)norverapamil nos **grupos controle, etanol e gasolina** tratados com verapamil racêmico está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Disposição cinética dos enantiômeros (-)-(S)-norverapamil e (+)-(R)norverapamil nos **grupos controle, gasolina e etanol** (n=8 para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média ± desvio padrão.

AUC⁰-∞(ng.h.mL⁻¹)	AUC <sub>(-)</sub> /AUC <sub>(+)</sub>
$246,00 \pm 42,64$	2,30
106,97 ± 21,78	
$197,01 \pm 23,32^{*}$	2,36
$83,54 \pm 10,52^{*}$	
80,20 ± 16,24 <sup>*</sup>	1,85
$43,39 \pm 7,99^{*}$	
	AUC <sup>0-<math>\infty</math></sup> (ng.h.mL <sup>-1</sup> ) 246,00 ± 42,64 106,97 ± 21,78 197,01 ± 23,32 <sup>*</sup> 83,54 ± 10,52 <sup>*</sup> 80,20 ± 16,24 <sup>*</sup> 43,39 ± 7,99 <sup>*</sup>

\* p<0,05 (controle vs gasolina e controle vs etanol)

# 4.3 Análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos

A Figura 19 apresenta os cromatogramas obtidos na análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos.



**Figura 19.** Análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos. Cromatogramas referentes a (A) amostra de plasma branco, (B) amostra de plasma fortificada com ibuprofeno e (C) amostra de plasma de animal tratado com ibuprofeno racêmico. Pico (1) (-)-(R)-ibuprofeno, (2) (+)-(S)-ibuprofeno, (3) (-)-(R)-fenoprofeno (PI), (4) (+)-(S)-fenoprofeno.

As Figuras 20 e 21 mostram, respectivamente, as curvas de calibração para os enantiômeros (-)-(R)-ibuprofeno e (+)-(S)-ibuprofeno.



**Figura 20.** Curva de calibração para o enantiômero (-)-(R)-ibuprofeno no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,025-50 µg/mL.



**Figura 21.** Curva de calibração para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,025-50 µg/mL.

O Efeito matriz para o ibuprofeno está apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Efeito matriz para o ibuprofeno e padrão interno (PI) em um *pool* de plasma de ratos.

Concentração (µg/mL)	Efeito Matriz (%)		
	(-)-(R) ibuprofeno	(+)-(S) ibuprofeno	PI
0,06	88,95	92,83	96,37
20	100,87	101,03	
40	105,00	105,12	

A tabela 6 mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da recuperação absoluta, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-ensaios dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos.

	(-)-(R)-ibuprofeno	(+)-(S)-ibuprofeno
Recuperação absoluta (%)		
0,06 µg/mL	103	101
20 µg/mL	80	80
40 µg/mL	94	93
Linearidade (µg/mL)	0,025-50	0,025-50
Equação da reta	0,109126x+0,00104824	0,111279x+0,00216682
R <sup>2</sup>	0,997	0,998
Limite de Quantificação (µg/mL)	0,025	0,025
Precisão (CV %, n = 10)	7,32	11,15
Exatidão (Inexatidão %)	10	0, 10
Precisão interensaios (CV %)		
0,06µg/mL (n = 5)	5,13	6,19
20 µg/mL (n = 5)	9,01	10,72
40 µg/mL (n = 5)	4,93	4,45
Precisão intra-ensaio (CV %)		
0,06 μg/mL (n = 5)	10,36	6,61
20 µg/mL (n = 5)	5,50	4,48
40 µg/mL (n =5)	7,26	8,09
Exatidão interensaios		
(Inexatidão %)		
0,06 µg/mL (n = 5)	1,93	4,00
20 μg/mL (n = 5)	1,67	-1,87
40µg/mL (n = 5)	-2,71	-2,68
Exatidão intra-ensaio		
(Inexatidão %)		
0,06 μg/mL (n = 5)	4,00	1,00
20 µg/mL (n = 5)	-11,36	-10,61
40µg/mL (n = 5)	-7,25	-7,24

**Tabela 6.** Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos.

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/ média) x 100]; R<sup>2</sup>=coeficiente de correlação linear. % Inexatidão= [(C<sub>obs</sub>-C<sub>adicionada</sub>)/C<sub>adicionada</sub>]x 100.

Os dados obtidos no estudo da estabilidade dos enantiômeros do Ibuprofeno em plasma de ratos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Estudo da estabilidade de curta duração, ciclo congelamento/descongelamento, pós processamento e longa duração do método de análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos.

Concentração	Curta Duração (4h)	Congelamento Descongelamento (3 ciclos)	Pós processamento (24h)	Longa duração (12 meses)
		De	esvio (%)	
(0,06 µg/mL)				
(-)-(R)-ibuprofeno	0,69	2,96	4,16	6,41
(+)-(S)-ibuprofeno	8,00	2,38	7,73	2,96
(40 µg/mL)				
(-)-(R)-ibuprofeno	0,62	14,02	11,26	12,37
(+)-(S)-ibuprofeno	1,92	11,40	11,14	6,87

A disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-ibuprofeno e (-)-(R)-ibuprofeno nos **grupos controle, etanol e gasolina** tratados com ibuprofeno racêmico está apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8.** Disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-ibuprofeno e (-)-(R)ibuprofeno nos **grupos controle, gasolina e etanol** (n=8 para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média ± desvio padrão.

	AUC <sup>0-∞</sup> (µg.h.mL <sup>-1</sup> )	Cl/f (L.h <sup>-1</sup> .Kg <sup>-1</sup> )	AUC(+)/AUC(-)
Grupo controle			
(+)-(S)-ibuprofeno	140,98 ± 13,21	88,67 ± 3,32	6,00
(-)-(R)-ibuprofeno	$23,48 \pm 4,43$	532,31 ± 40,16	
Grupo gasolina			
(+)-(S)-ibuprofeno	$46,74 \pm 4,70^{*}$	$267,43 \pm 10,76^{*}$	
(-)-(R)-ibuprofeno	$15,98 \pm 2,98^{*}$	$782,38 \pm 58,39^{*}$	2,92
Grupo etanol			
(+)-(S)-ibuprofeno	$72,45 \pm 10,09^{*}$	172,54 ± 9,62*	2,92
(-)-(R)-ibuprofeno	24,81 ± 3,71	503,76±30,13	

\* p<0,05 (controle vs gasolina e controle vs etanol)

# 4.4 Análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos

As Figuras 22, 23 e 24 apresentam os cromatogramas que mostram a separação dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos.





**Figura 23.** Análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma. Cromatogramas referentes a (B) amostra de plasma fortificada com fluoxetina 50 ng/ml, pico 1 (+)-(S)-fluoxetina e 2 (-)-(R)-fluoxetina e metoprolol (PI).



**Figura 24.** Análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma. Cromatogramas referentes a (C) amostra de plasma de rato tratado com fluoxetina racêmica. Pico 1 (+)-(S)-fluoxetina e 2 (-)-(R)-fluoxetina, 3 e 4 metoprolol (PI).

A Figura 25 demonstra a análise do espectro de massas do íon produto (A) e do íon molecular protonado (B) da fluoxetina.



Figura 25. Espectro de massas do íon produto (A) e do íon molecular protonado (B) da fluoxetina.

As Figuras 26 e 27 mostram respectivamente as curvas de calibração para os enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos.



**Figura 26.** Curva de calibração para o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,5- 500 ng/mL.



**Figura 27.** Curva de calibração para o enantiômero (-)-(R)-fluoxetina no intervalo de concentrações plasmáticas de 0,5- 500 ng/mL.

O Efeito matriz para a fluoxetina está apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9.** Efeito matriz para a fluoxetina e padrão interno (PI) em um *pool* de plasma de ratos.

Concentração (ng/mL)	Efeito Matriz (%)		
	(+)-(S) fluoxetina	(-)-(R) fluoxetina	PI
1	81,20	80,78	94,71
200	86,39	90,33	
400	81,89	89,05	

A Tabela 10 mostra os resultados referentes aos estudos de recuperação, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-ensaios do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos.

	(+)-(S)-fluoxetina	(-)-(R)-fluoxetina
Recuperação absoluta (%)		
1 ng/mL	87,60	96,27
200 ng/mL	84,33	79,67
400 ng/mL	81,40	70,79
Linearidade (ng/mL)	0,5 – 500	0,5-500
Equação da reta	0,0771619X+0,020	0,0782715X+0,02
	8118	76739
R <sup>2</sup>	0,997	0,997
Limite de Quantificação (ng/mL)	0,50	0,50
Precisão (CV %, n = 10)	9,21	9,73
Exatidão (Inexatidão %)	-7,62	-5,35
Precisão interensaios (CV %)		
1 ng/mL (n = 5)	5,98	5,83
200 ng/mL (n = 5)	5,66	6,78
400 ng/mL (n = 5)	6,28	7,43
Precisão intra-ensaio (CV %)		
1 ng/mL (n = 5)	5,51	5,00
200 ng/mL (n = 5)	7,57	7,18
400 ng/mL (n =5)	3,18	3,19
Exatidão interensaios		
(Inexatidão %)		
1 ng/mL (n = 5)	-0,99	-2,87
200 ng/mL (n = 5)	-6,28	-5,94
400 ng/mL (n = 5)	-1,70	-0,98
Exatidão intra-ensaio		
(Inexatidão %)		
1 ng/mL (n = 5)	7,58	-8,74
200 ng/mL (n = 5)	-11,71	-12,78
400 ng/mL (n = 5)	-9,53	-10,74

**Tabela 10.** Limites de confiança do método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos.

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/ média) x 100]; r=coeficiente de correlação linear. % Inexatidão= [(C<sub>obs</sub>-C<sub>adicionada</sub>)/C<sub>adicionada</sub>]x 100.
Os dados obtidos no estudo de estabilidade dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Estudo de estabilidade de curta duração e ciclos congelamento/descongelamento e pós processamento para o método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos.

Concentração	Curta Duração (4h)	Congelamento Descongelamento (3 ciclos)	Pós processamento (24h)
	Desvio (%)		
(1 ng/mL)			
(+)-(S)-fluoxetina	0,69	2,96	4,16
(-)-(R)-fluoxetina	8,00	2,38	7,73
(400 ng/mL)			
(+)-(S)-fluoxetina	0,62	14,02	11,26
(-)-(R)-fluoxetina	1,92	11,40	11,14

A disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-fluoxetina e (-)-(R)-fluoxetina nos **grupos controle, etanol e gasolina** tratados com fluoxetina racêmica está apresentada na Tabela 12.

**Tabela 12.** Disposição cinética dos enantiômeros (+)-(S)-fluoxetina e (-)-(R)-fluoxetina nos **grupos controle, gasolina e etanol** (n=8 para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média ± desvio padrão.

	AUC <sup>0-∞</sup> (ng.h.mL <sup>-1</sup> )	Cl/f (L.h <sup>-1</sup> .Kg <sup>-1</sup> )	AUC(+)/AUC(-)
Grupo controle			
(+)-(S)-fluoxetina	650,91 ± 182,54	$7,68 \pm 4,64$	
(-)-(R)-fluoxetina	386,48 ± 130,90	12,94 ± 4,38	1,68
Grupo gasolina			
(+)-(S)- fluoxetina	$923,33 \pm 201,70^{*}$	$5,42 \pm 1,40^{*}$	
(-)-(R)- fluoxetina	857,71 ± 196,96 <sup>*</sup>	$5,83 \pm 1,34^{*}$	1,08
Grupo etanol			
(+)-(S)- fluoxetina	766,05±103,38	$6,52 \pm 0,78$	1,38
(-)-(R)- fluoxetina	$555,09 \pm 86,22^{*}$	$9,01 \pm 1,40^{*}$	

\* p<0,05 (controle *vs* gasolina e controle *vs* etanol

## **5 DISCUSSÃO**

O estudo reporta a influência da exposição inalatória de ratos ao etanol combustível e à gasolina (6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 6 semanas) na farmacocinética dos enantiômeros do verapamil, ibuprofeno e fluoxetina. A execução dos protocolos experimentais exigiu o desenvolvimento e a validação dos métodos de análise dos enantiômeros do ibuprofeno e da fluoxetina em plasma de ratos empregando LC-MS/MS, em função das exigências do emprego de baixos volumes de plasma e da obtenção de alta sensibilidade devido a administração de análise do verapamil e seu metabólito norverapamil foi desenvolvido e validado em estudo anterior do grupo (MATEUS et al., 2007).

O estudo exigiu ainda a construção e a validação de uma câmara de exposição com capacidade suficiente para a realização dos experimentos de exposição aos combustíveis em período razoável de tempo. Nos ensaios de validação da câmara para exposição apenas pelo nariz, os coeficientes de variação apurados indicam que a variabilidade das concentrações entre os planos da câmara (portas da camada superior e inferior) e entre as portas de exposição no mesmo plano não diferem expressivamente entre si. Também, não diferem entre si as concentrações médias apuradas para cada tempo durante o ensaio de 6 horas (Tabelas 1 e 2). Pode-se considerar, portanto, que o equipamento mostrou-se adequado para manter a homogeneidade e a estabilidade das concentrações de ambos os combustíveis etanol e gasolina durante o tempo de experimentação.

As vantagens dessa forma de exposição são a utilização de menor quantidade de solvente e maior controle sobre a exposição, resultando maior uniformidade, além de evitar a absorção dos combustíveis automotivos por outras vias (HOLÄNDER, 1988; KENNEDY; VALENTINE, 1994).

A análise dos enantiômeros do verapamil e do metabólito norverapamil foi conduzida com apenas 100 µL de plasma, empregando LC-MS/MS e separação em coluna de fase estacionária quiral Chiralpak AD. O método desenvolvido e validado por Mateus et al. (2007) mostrou-se rápido com tempos de retenção de 12 minutos para a eluição dos enantiômeros do verapamil e do norverapamil, com fase móvel constituída por hexano:etanol:isopropanol (88:6:6,v/v) e 0,1% de dietilamina. O método mostrou linearidade de 1-250 ng de cada enantiômero do verapamil ou norverapamil/mL de plasma de rato.

Os resultados mostram que a disposição cinética do verapamil é enantiosseletiva em ratos Wistar do grupo controle (Tabela 3) com acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil e com razão de AUC<sup>0-∞</sup> de 3,64 (AUC<sup>0-∞</sup> 333,95 *v*s 91,84 ng.h.mL<sup>-1</sup>). Tal acúmulo plasmático é conseqüente do menor *clearance* aparente do (-)-(S)-verapamil (14,97 *v*s 54,44 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>). Também se observa enantiosseletividade na disposição cinética do metabólito norverapamil nos animais do grupo controle (Tabela 4), com acúmulo plasmático do (-)-(S)-norverapamil (AUC<sup>0-∞</sup> 246,00 *v*s 106,97 ng.h.mL<sup>-1</sup>), com razão enantiomérica de AUC<sub>S/R</sub> de 2,30.

Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo de Mateus et al. (2007), os quais reportam que na administração oral de verapamil racêmico a ratos machos Wistar (10 mg/kg) igualmente contidos em câmara de exposição durante 6h/dia, por 5 dias consecutivos, ocorre acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil (411,18 *vs* 173,81 ng.h.mL<sup>-1</sup>) e do seu metabólito (-)-(S)-norverapamil (180,04 *vs* 71,58 ng.h.mL<sup>-1</sup>). Hanada et al. (1998) relatam que as concentrações de (-)-(S)-verapamil em plasma de ratos são aproximadamente o dobro daquelas observadas para o enantiômero (+)-(R)-verapamil. Bhatti; Foster (1997) relatam que na administração oral de verapamil racêmico a ratos *Sprague-Dawley* ocorre acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil, sendo que o *clearance* do (+)-(R) verapamil mostrou-se duas vezes maior do que o do seu antípoda. No presente estudo observou se que o valor do *clearance* do (+)-(R)- verapamil é três vezes maior do que o do seu antípoda, devendo-se ressaltar, no entanto, que os animais do presente estudo foram submetidos a uma condição de estresse por seis semanas na câmara de exposição.

As razões enantioméricas de concentrações plasmáticas encontradas no presente estudo, com acúmulo plasmático do (-)-(S)-verapamil e do (-)-(S)- norverapamil, são opostas aquelas observadas em estudos em humanos descritos na literatura. Robinson; Mehvar (1996) observam que a diferença das razões enantioméricas pode ser explicada pela ligação do fármaco às proteínas plasmáticas. As frações livres do (+)-(R)-verapamil e (+)-(R)-norverapamil são maiores em ratos do que aquelas observadas em estudos clínicos com humanos (BHATTI; FOSTER, 1997).

A disposição cinética do verapamil para os animais do grupo exposto ao etanol combustível, à semelhança do observado para o grupo controle, é

enantiosseletiva com acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil, razão enantiomérica de AUC<sub>S/R</sub> de 3,64 (AUC<sup>0- $\infty$ </sup> 122,81 vs 33,77 ng.h.mL<sup>-1</sup>) e maiores valores de clearance em relação ao grupo controle para ambos os enantiômeros (Tabela 3). Os dados apresentados mostram que a exposição inalatória ao etanol combustível reduz a AUC<sup>0-∞</sup> e aumenta o *clearance* de ambos os enantiômeros do verapamil em aproximadamente 2,7 vezes em relação ao grupo controle. Os dados obtidos sugerem indução do CYP3A considerando que o CYP3A4 é o principal responsável pela N-desalquilação com formação dos enantiômeros (+)-(R) e (-)-(S)norverapamil, embora o CYP1A2 e o CYP3A5 também contribuam, em menor proporção, para a formação desses metabólitos (TRACY et al, 1999). Por outro lado, os valores de AUC<sup>0-∞</sup> obtidos para ambos os enantiômeros do metabólito norverapamil mostraram-se menores no grupo exposto ao etanol quando comparados ao grupo controle (Tabela 4). Ressalta-se que o norverapamil é um metabólito intermediário, cujo valor de AUC reflete não somente a sua formação dependente do CYP3A como também o metabolismo consecutivo para o metabólito D620, dependente do CYP3A4, CYP3A5 e CYP2C8, ou para o metabólito PR-22, dependente do CYP2C8 (TRACY et al, 1999).

A disposição cinética do verapamil para os animais do grupo exposto à gasolina, à semelhança do grupo controle, também apresenta enantiosseletivade com acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-verapamil (razão enantiomérica de AUC<sub>S/R</sub> de 4,10) e maiores valores de *clearance* aparente para o enantiômero (+)-(R)-verapamil (61,99 vs 15,10 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) (Tabela 3). A exposição à gasolina não resultou em alterações significativas nos valores de AUC<sup>0-∞</sup> e *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do verapamil (Tabela 3), sugerindo que a exposição inalatória à gasolina durante 6 semanas não altera a atividade do CYP3A. No entanto, os dados mostram redução nos valores de AUC<sup>0-∞</sup> de ambos os enantiômeros do norverapamil (Tabela 4), provavelmente em função da participação do CYP2C8 no seu metabolismo ulterior (TRACY et al, 1999). A indução do CYP2C8 pela exposição inalatória à gasolina será inferida no presente trabalho durante a discussão dos resultados da farmacocinética do ibuprofeno.

A análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma tem sido descrita por HPLC com detecção por ultravioleta ou por espectrometria de massas (MS/MS), empregando procedimentos de derivatização com reagentes enantiomericamente puros (WRIGHT et al.; 1992; KONDO et al.; 1994; TAN et al., 1997), adição de seletores quirais como β-ciclodextrinas na fase móvel (HASSSAN et al.; 2008) ou colunas com fases estacionárias quirais (AHN et al.; 1994; BONATO et al., 2003; TENG et al.; 2003). Outros métodos empregando eletroforese capilar também são descritos (JABOR et al.; 2002; GLÓWKA; KARAZNIEWICZ; 2007).

O método desenvolvido e validado no presente estudo empregando LC-MS/MS acoplado a coluna de fase quiral mostrou-se sensível para quantificar os enantiômeros do ibuprofeno em apenas 200 µL de plasma, em concentrações tão baixas quanto 25 ng de cada enantiômero/mL. Os enantiômeros do ibuprofeno foram separados na coluna de fase quiral Chirex em 15 min, representando uma redução de cerca de 50% do tempo de corrida cromatográfica relatado por Teng et al. (2003), empregando a coluna Chiralpak AD-RH com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila-água-ácido fosfórico-trietilamina. A ordem de eluição dos enantiômeros, na sequência (-)-(R)-ibuprofeno e (+)-(S)-ibuprofeno foi estabelecida com base no estudo de Teng et al. (2003).

Os dados apresentados na Tabela 5 indicam que o efeito matriz é praticamente ausente na análise dos enantiômeros do ibuprofeno e do padrão interno (fenoprofeno). Os valores se mantiveram próximos a 100% quando foram comparadas as alturas dos picos resultantes da injeção de soluções padrão em fase móvel e de soluções padrão adicionadas a extratos de *pool* de plasma branco de ratos.

Os enantiômeros do ibuprofeno foram extraídos de alíquotas de 200 µL de plasma, em pH ácido, usando como solvente extrator a mistura hexano:éter diisopropílico (50:50,v/v). As recuperações obtidas para ambos os enantiômeros são maiores que 80% e independem da concentração no intervalo de 0,025-50µg de cada enantiômero/mL de plasma (Tabela 6). Bonato et al. (2003) relatam recuperação entre 69% a 84% quando amostras de plasma humano são extraídas com hexano e acetato de etila (80:20, v/v). Teng et al. (2003) obtiveram recuperação de 85% a 95% na análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de rato usando como solvente extrator a mistura de 2,2,4-trimetilpentano e isopropanol (95:5,v/v).

O limite de quantificação de 25 ng de cada enantiômero do ibuprofeno/mL de plasma (Tabela 6) permite situar o método desenvolvido como mais sensível que o método de Bonato et al. (2003) que também emprega coluna de fase quiral com detecção por LC-MS/MS e infere limite de quantificação de 120 ng de cada

enantiômero/mL de plasma a partir de extrações de alíquotas de 500 µL de plasma humano.

Os limites de quantificação obtidos no presente trabalho permitem a análise de amostras de plasma de ratos coletadas até 8 horas após a administração de dose única oral de 25 mg/kg de ibuprofeno racêmico. O método mostrou linearidade no intervalo de 0,025-50 µg de cada enantiômero/mL de plasma de rato, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 (Figuras 20 e 21).

Nos estudos de precisão intra e inter-ensaios, os coeficientes de variação obtidos são iguais ou inferiores a 15% (Tabela 6) o que indica a alta precisão do método analítico. Os resultados obtidos nos testes de exatidão apresentados na Tabela 6 estão dentro do erro de 15%, demonstrando que o método além de preciso é exato.

O ibuprofeno demonstrou estabilidade em plasma de ratos durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente, durante 24h no auto-injetor a 5<sup>°</sup> C e durante 6 meses em freezer a -20°C, tendo sido revelados desvios inferiores a 15% na comparação com amostras recém preparadas (Tabela 7).

Os animais do grupo controle tratados com dose única oral de 25 mg/kg de ibuprofeno racêmico mostram valores de AUC<sup>0-∞</sup> maiores para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno em função da inversão quiral unidirecional (23,48 vs 140,98 µg.h.mL<sup>-1</sup>) e valores de *clearance* aparente maiores para o (-)-(R)-ibuprofeno (532,31 vs 88,67 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) (Tabela 8). Os dados obtidos estão de acordo com os valores descritos por Teng et al. (2003) (97,9 vs 29,9 µg.h.mL<sup>-1</sup>) e Sattari; Jamali (1994) (85,3 vs 24,6 µg.h.mL<sup>-1</sup>), os quais também relatam valores de AUC<sup>0-∞</sup> maiores para o enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno.

Os resultados obtidos mostram razão enantiomérica (+)-(S)/(-)-(R)-ibuprofeno de AUC de 6 para os animais do grupo controle (Tabela 8), enquanto Teng et al. (2003) e Sattari; Jamali (1994) relatam razões enantioméricas de 3,27 e 3,62, respectivamente, em animais não submetidos à condição de estresse do presente estudo.

Os valores de AUC<sup>0-∞</sup>(24,81 *vs* 72,45  $\mu$ g.h.mL<sup>-1</sup>) e os valores de *clearance* aparente (503,76 *vs* 172,54 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) observados no grupo de animais expostos ao etanol combustível, como também os valores de AUC<sup>0-∞</sup>(15,98 *vs* 46,74  $\mu$ g.h.mL<sup>-1</sup>) e os valores de *clearance* aparente (782.38 *vs* 267.43 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) observados no grupo

de animais expostos à gasolina, denunciam a observação da inversão quiral unidirecional do (-)-(R)-ibuprofeno para o (+)-(S)-ibuprofeno (Tabela 8).

A exposição inalatória ao etanol combustível reduziu significativamente os valores de AUC<sup>0-∞</sup> do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno e aumentou em duas vezes o seu *clearance* aparente em relação ao controle. Considerando que o CYP2C9 é responsável pela oxidação do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, enquanto o CYP2C8 está envolvido principalmente no metabolismo do (-)-(R)-ibuprofeno (GLOWKA; KARAZNIEWICZ, 2007), os dados do presente estudo permitem inferir que a exposição inalatória ao etanol combustível induz o CYPC9.

De outro lado, os animais do grupo exposto à gasolina mostram redução dos valores de AUC<sup>0-∞</sup> e aumento do *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno em relação ao controle (Tabela 8), sugerindo indução do CYP2C8 e do CYP2C9 envolvidos no metabolismo do ibuprofeno (GLOWKA; KARAZNIEWICZ, 2007).

A análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma tem sido descrita por HPLC com detecção por ultravioleta, florescência ou por espectrometria de massas (MS/MS) empregando procedimentos de derivatização (GUO et al., 2003; YU et al, 2006) ou colunas com fases estacionárias quirais (OLSEN et al., 1998; BAKHTIAR; TSE, 2000; GATTI et al, 2003; JIE et al., 2007; CHOW et al., 2011).

O presente estudo relata o desenvolvimento e a validação de um método de análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos empregando LC-MS/MS e com limite de quantificação de 0,5 ng de cada enantiômero/mL de plasma. O método utiliza apenas 200 µL de plasma e foi aplicado no estudo da influência da exposição inalatória ao etanol combustível e à gasolina na farmacocinética dos enantiômeros da fluoxetina.

Os enantiômeros da fluoxetina foram separados na coluna de fase quiral Chirobiotic V, como anteriormente descrito por Bakhtiar; Tse (2000) e Borges et al. (2009). Outras opções para a resolução dos enantiômeros da fluoxetina observadas na literatura são as colunas de fases quirais OD-H (OLSEN et al.; 1998; ZHOU et al.; 2005), OD-R (ZUCCARO et al.; 1998) e AGP (CHOW et al.; 2011). A ordem de eluição dos enantiômeros da fluoxetina foi estabelecida com base no estudo de Guo et al. (2002), os quais reportam maiores concentrações plasmáticas do enantiômero (+)-(S)-fluoxetina.

A avaliação do efeito matriz (Tabela 9) na análise dos enantiômeros da fluoxetina e do padrão interno metoprolol em plasma de ratos mostra valores de aproximadamente 85% quando foram comparadas as alturas dos picos resultantes da injeção de soluções padrão em fase móvel e de soluções padrão adicionadas a extratos de *pool* de plasma branco de ratos. No entanto, ressalta-se que a análise de amostras de plasma com hemólise deve ser evitada em função de resultar em significativo efeito matriz.

Os enantiômeros da fluoxetina foram extraídos de alíquotas de 200 µL de plasma, em pH alcalino, usando como solvente extrator a mistura hexano: álcool isoamílico (99:1,v/v). As recuperações obtidas para ambos os enantiômeros são maiores que 70% e independem da concentração no intervalo de 0,5-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma (Tabela 10).

Gatti et al. (2003) relatam recuperação entre 72-77% quando amostras de plasma humano foram precipitadas com acetonitrila, extraídas com hexano:isopropanol (97:3, v/v) e submetidas a um procedimento de *clean up* com ácido fosfórico 20 mM. Unceta et al. (2007) mostram recuperação de 92-95% na análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de rato usando extração em fase sólida em colunas CN. Chow et al.(2011) mostram recuperações de 107-122% na extração de plasma de ovinos em meio básico com éter metil tert-butílico.

O volume de amostra de 200 µL de plasma e o limite de quantificação de 0,5 ng de cada enantiômero da fluoxetina/mL de plasma (Tabela 10), permitem situar o método desenvolvido no presente estudo como mais sensível que o método de Chow et al. (2011) que também emprega coluna de fase quiral com detecção por LC-MS/MS e infere limite de quantificação de 1 ng de cada enantiômero/mL de plasma a partir de extrações de alíquotas de 300 µL de plasma de ovino. O estudo de Shen et al. (2002), empregando LC-MS/MS e alíquotas de 200 µL de plasma, mostra limite de quantificação de 2 ng de cada enantiômero/mL de plasma. O limite de quantificação de 0,5 ng de cada enantiômero da fluoxetina/mL de plasma permitiu a análise de amostras de plasma de ratos coletadas até 12 horas após a administração de dose única oral de 10 mg/kg de fluoxetina racêmica.

As curvas de calibração foram construídas empregando as razões de alturas padrão/padrão interno *versus* as concentrações plasmáticas dos enantiômeros da fluoxetina no intervalo de 0,5-500 ng de cada enantiômero/mL de plasma de rato, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 (Figuras 26 e 27).

Nos estudos de precisão intra e inter-ensaios, os coeficientes de variação obtidos são iguais ou inferiores a 15% o que indica a alta precisão do método analítico. Os resultados obtidos nos testes de exatidão estão dentro do erro aceitável de 15%, demonstrando que o método além de preciso é exato (Tabela 10).

A fluoxetina demonstrou estabilidade em plasma de rato durante três ciclos de congelamento e descongelamento, durante 4h em temperatura ambiente, após o processamento e durante 24h no auto-injetor a 5<sup>o</sup>C, já que foram observados desvios inferiores a 15% na comparação com as amostras recém-preparadas (Tabela 11).

O método desenvolvido e validado no presente estudo permite a resolução direta dos enantiômeros da fluoxetina em coluna de fase quiral, emprega apenas 200 µL de plasma e apresenta alta sensibilidade traduzida por limite de quantificação de 0,5 ng de cada enantiômero/mL de plasma podendo ser aplicado no estudo de disposição cinética dos enantiômeros da fluoxetina administrada como mistura racêmica em regime de dose única oral a ratos.

Os animais do grupo controle mostram acúmulo plasmático (AUC<sup>0- $\infty$ </sup> 650,91 *vs* 386,48 ng.h.mL<sup>-1</sup>) com menor valor de *clearance* aparente (7,68 *vs* 12,93 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) para o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina (Tabela 12). O acúmulo plasmático do enantiômero (+)-(S)-fluoxetina está de acordo com o estudo reportado por Guo et al. (2002), embora no presente estudo os animais tenham sido submetidos a uma condição de estresse pela repetida contenção (6h/dia) durante seis semanas.

Nos animais expostos ao etanol combustível também observa-se acúmulo plasmático (AUC<sup>0-∞</sup> 766,05 *vs* 555,09 ng.h.mL<sup>-1</sup>) e menor valor de *clearance* aparente (6,52 *vs* 9,01 L.h<sup>-1</sup>.Kg<sup>-1</sup>) para o enantiômero (+)-(S)-fluoxetina (Tabela 12). Foi observada diferença em relação ao grupo controle apenas para o enantiômero (-)-(R)-fluoxetina, sugerindo que o etanol combustível inibe preferencialmente o metabolismo do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina, inibindo o CYP2D. Os valores de *clearance* da fluoxetina para os enantiômeros (-)-(R)-fluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina diferem entre metabolizadores extensivos (36 e 40 L/h) e metabolizadores lentos (3 e 17 L/h) do CYP2D6 (FJORDSIDE et al.,1999), ou seja, o *clearance* do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina e metabolizadores lentos do correspondente (+)-(S)-fluoxetina em metabolizadores lentos do cyP2D6. Em outras palavras, o *clearance* do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina parece depender quase exclusivamente do CYP2D.

Busby et al. (1998) relatam que, em microssomos humanos, o etanol na concentração de 0,1% inibe o CYP1A1, CYP2B6, CYP2C19, enquanto na concentração de 0,3% inibe o CYP2D6. Li et al. (2010) relatam que a inibição do etanol é dose dependente, e que em ratos o CYP2D e o CYP2E são facilmente inibidos por diferentes solventes.

Nos animais expostos à gasolina observa-se aumento dos valores de AUC<sup>0-∞</sup> para ambos os enantiômeros da fluoxetina, porém de forma mais acentuada para o enantiômero (-)-(R)-fluoxetina, resultando em razão enantiomérica (+)-(S)/(-)-(R) de AUC de aproximadamente 1 e portanto em perda da enantiosseletividade. Os dados apresentados na Tabela 12 ainda mostram que a exposição crônica à gasolina reduz o clearance do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina em aproximadamente 55%, enquanto o do enantiômero (+)-(S)-fluoxetina é reduzido em somente 30%. A redução da razão enantiomérica (+)-(S)/(-)-(R) de AUC nos animais expostos à gasolina sugere inibição preponderante do CYP2D envolvido no metabolismo do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina, pois, os valores de *clearance* da fluoxetina para os enantiômeros (-)-(R)-fluoxetina e (+)-(S)-fluoxetina diferem entre metabolizadores extensivos (36 e 40 L/h) e metabolizadores lentos (3 e 17 L/h) do CYP2D6 (FJORDSIDE et al.,1999). Em outras palavras, o *clearance* do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina é reduzido em maior extensão do que o do correspondente (+)-(S)-fluoxetina em metabolizadores lentos do CYP2D6.

Em conclusão, a exposição inalatória de ratos ao etanol combustível na concentração de 2 LEO-STEL (6 h/dia por 6 semanas) mostrou indução do CYP2C através da redução do AUC e do aumento do *clearance* aparente do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento da AUC e redução do clearance aparente do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina e indução do CYP3A evidenciada por redução dos valores de AUC e aumento dos valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do verapamil. A exposição inalatória de ratos à gasolina na concentração de 2-LEO-TWA (6h/dia por 6 semanas) também mostrou indução do CYP2C denotada pela redução do AUC e do aumento do *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos enantiômeros de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos enantiômeros de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos enantiômeros da fluoxetina e, em não alteração do CYP3A evidenciada pela obtenção de valores de AUC e *clearance* aparente do verapamil similares aos do grupo controle.

### **6 CONCLUSÕES**

1- O método desenvolvido e validado para a análise dos enantiômeros do ibuprofeno em plasma de ratos empregando LC-MS/MS mostrou-se sensível, preciso e exato para quantificar os enantiômeros do ibuprofeno em apenas 200 μL de plasma.

2- O método desenvolvido e validado para a análise dos enantiômeros da fluoxetina em plasma de ratos empregando LC-MS/MS mostrou-se sensível, preciso e exato para quantificar os enantiômeros da fluoxetina em apenas 200 µL de plasma.

3- A exposição inalatória ao etanol combustível na concentração de 2 LEO-STEL (6 h/dia por 6 semanas) mostrou indução do CYP2C através da redução do AUC e do aumento do *clearance* aparente do enantiômero (+)-(S)-ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento da AUC e redução do *clearance* aparente do enantiômero (-)-(R)-fluoxetina e, indução do CYP3A evidenciada por redução dos valores de AUC e aumento dos valores de *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do verapamil.

4- A exposição inalatória à gasolina na concentração de 2-LEO-TWA (6h/dia por 6 semanas) mostrou indução do CYP2C denotada pela redução do AUC e do aumento do *clearance* aparente de ambos os enantiômeros do ibuprofeno, inibição do CYP2D indicada pelo aumento dos valores de AUC e redução dos valores de *clearance* aparente de ambos enantiômeros da fluoxetina e, em não alteração do CYP3A evidenciada pela obtenção de valores de AUC, e *clearance* aparente do verapamil similares aos do grupo controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. Y.; SHIU, G. K.; TRAFTON, W. F.; DOYLE, T. D. Resolution of the enantiomers of ibuprofen; comparison study of diastereomeric method and chiral stationary phase method. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v.653, p. 163-169, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução- RE nº 899, de 29 de maio de 2003- Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, 2003.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNAMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS 2011 & TLVs® and BEIs®. Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, 2011. CD-ROM.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNAMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices**. 7th ed. Cincinnati: ACGIH, 2001.

AMISAKI, T. Gaussian quadrature as a numerical integration method for estimating area under the curve. **Biol Pharm Bull**, Tokyo, v. 24, p.70-77, 2001.

ASAFU-ADJAYE, E. B; SHIU, G. K.Solid-phase extraction high performance liquid chromatography determination of verapamil and norverapamil enantiomers in urine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v.707, p. 161-167, 1998.

BAKHTIAR, R.;TSE, F. L. S. High-throughput chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 14, p. 1128-1135, 2000.

BHATTI, M. M; FOSTER, R. T. Pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil after intravenous and oral administration of racemic verapamil in a rat model. **Biopharmaceutical & Drug Disposition**, Chichester, v. 18, n. 5, p.387-396, 1997.

BONATO, P. S; DEL LAMA, M. P. F. M; CARVALHO, R. Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high performance liquid cromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.796, p. 413-420, 2003.

BORGES, K. B.; OKANO, L. T.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine by LC in culture medium for application in biotransformation studies employing fungi. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 70, p. 1335-1342, 2009.

BRADY, J. F.; XIAO, F.; GAPAC, J. M.; NING, S. M.; YANG, C. S. Alteration of rat liver microsomal monooxygenase activities by gasoline treatment. **Arch Toxicol**, Berlin, v. 64, p.677-679, 1990.

BROCKS, D. R. Drug disposition in three dimensions: an updateon stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm Drug Dispos**, Chichester, v. 27, p. 387-406, 2006.

BRUCKNER, V. J; WARREN, D. A. Toxic effects of solvents and vapor. In CASARETT, L; DOULL, J. **Toxicology. The basic science of poison:** 6 ed. New York: MacMillan Publishing Company, 2001, p. 869-916.

BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide and acetonitrile *in vitro* activities of cDNA-expressed human cytochrones P-450. **Drug Metab Dispos**, Baltimore, v. 27, n. 2, p. 246-249, 1999.

CAPELA, J.M.V., CAPELA, M.V, LEPERA, J.S. Estimação da área sob a curva para dados farmacocinéticos obtidos por amostragem esparsa. In: 34° Congresso Nacional de Matemática Aplicada e Computacional., Águas de Lindóia: 2012, *in press*.

CARDOSO, J. L. C. Influência da inalação de metanol na farmacocinética enantiosseletiva da fluvastatina em ratos. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

CATALUNA, R.; SILVA, R. Desenvolvimento de um equipamento para avaliação do efeito do etanol na pressão de vapor e entalpia de vaporização em gasolina automotiva. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.3, p. 580-585, 2006.

CHOW, T. W.; SZEITZ, A.; RURAK, D. W.; RIGGS, K. W. A validated enantiosselective assay for the simultaneous quantification of (R)-, (S)- fluoxetine and (R)-, (S)- norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Journal of chromatography **B**, Amsterdam, v. 879, p. 349-358, 2011.

CHU, I.; POON, R.; VALLI, V.; YAGMINAS, A.; BOWERS, W. J.; SEEGAL, R.; VINCENT, R. Effects of an ethanol-gasoline mixture:results of a 4-weeks inhalation study in rats. **Journal of applied Toxicology**, England, v. 25, p. 193-199, 2005.

DAVIES, N. M. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. **Clin Pharmacokinet**, New Zealand, v. 34(2), p. 101-154, 1998.

DENNINSON, J. E.; ANDERSEN, M. E.; DOBREV, I. D.; MUMTAZ, M. M.; YANG, R. S. H. PBPK modeling of complex hydrocarbon mixtures:gasoline. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.16, p. 107-119, 2004.

FJORDSIDE, L.; JEPPESEN, U.; EAP, C. B.; POWELL, K.;BAUMANN, P.; BROSEN, K. The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. **Pharmacogenetics**, Oxford, v.9, p.55-60,1999.

GATTI, G.; BONOMI, I.; MARCHISELLI, R.; FATTORE, C.; SPINA, E.; SCORDO, G.; PACIFICI, R.; PERUCCA, E. Improved enantioselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 784, p. 375-383, 2003.

GLOWKA, F.; KARAZNIEWICZ, M. Enantioselective CE method for pharmacokinetics studies on ibuprofen and its chiral metabolites with reference to genetic polymorphism. **Electrophoresis**, Germany, v. 28, p. 2726-2737, 2007.

GRACIANI, F. S. Influência do etilbenzeno na farmacocinética enantiosseletiva do metoprolol em ratos. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

GRAM, L. F. Drug theraphy:fluoxetine. **N Engl J Med**, United States, v. 331(20), p. 1354-1361, 1994.

GUO, X.; FUKUSHIMA, T.; LI, F.; IMAI, K. Determination of fluoxetine enantiomers in rat plasma by pre-column fluorescence derivatization and column-switching high performance liquid chromatography. **Analyst**, Picadlly, v.127, p.480-484, 2002.

GUO, X.; FUKUSHIMA, T.; LI, F.; IMAI, K. Determination of fluoxetine and norfluoxetine in rat plasma by HPLC with pré-column derivatization and fluorescence detection. **Biomed Chromatogr**, Chichester, v. 17, p. 1-5, 2003.

HAMITOUCHE, S.; POUPON, J.; DREANO, Y.; ANET, Y.; LUCAS, D. Ethanol oxidation into acetaldehyde by 16 recombinant human cytochrome P450 isoforms:role of CYP2C isoforms in human liver microsomes. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.167, p. 221-230, 2006.

HANADA, K.; AKIMOTO, S.; MITSUI, K., HASHIGUCHI, M.,OGATA, H. Quantitative determination of disopyramide, verapamil and flecainide enantiomers in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 710, p. 129-135, 1998.

HASSAN, A. S.; SPAIN, A.; UBRICH, N.; MAINCENT, P.; BOLZAN, C.; LEROY, P. Simple and sensitive HPLC method with fluorescence detection for the measurement of ibuprofen in rat plasma: application to a long lasting dosage form. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, England, v. 34, p. 1064-1070, 2008.

HOLÄNDER, W. Exposure facilities and aerosol generation and characterization for inhalation experiments. In: MOHR, U. **Inhalation toxicology**. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 67-85.

HUI, Y.; HUANG, N. H.; EBBERT, L.; BINA, H.; CHIANG, A.; MAPLES, C.; PRITT, M.; KERN, T.; PATEL, N. Pharmacokinetic comparisons of tail-bleeding with cannula or retro-orbital bleeding techniques in rats using six marketed drugs. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 56, p. 256-264, 2007.

HUTT, A. J. The development of single-isomer molecules: why and how. **CNS Spectr**, New York, v. 7, n. 4, p. 14-22, 2002.

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

IDA, S.;YOKOTA, M.;YOSHIOKA, H.; YOSHIHARU, T. Single exposure to gasoline or ether reduces cytochrome P450 activies without affecting UDP-Glucuronosyltransferase activity in rat liver. **Journal of Occupational Health,** Tokyo, v. 42, p. 84-85, 2000.

INGELMAN-SUNDERBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P-450 drug metabolism for drug development. **Drug Metab Dispos**, Baltimore, v. 29, n. 4, p. 570-573, 2001.

ITOH, T.; MARUYAMA, J.; TSUDA, Y.;YAMADA, H. Stereoselective Pharmacokinetics of Ibuprofen in Rats: Effect of Enantiomer- Enantiomer Interaction in Plasma Protein Binding. **Chirality**, New York, v. 9, p. 354-361, 1997.

JABOR, V. A. P.; LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S. Enantioselective analysis of ibuprofen in human plasma by anionic cyclodextrin-modified eletrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, Germany, v.23, p.3041-3047, 2002.

JIE, S.;WENG, Y. Y.; FENG, W.;DONG, W. P. Comparison of the performance of chiral stationary phase for separation of fluoxetine enantiomers. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v.8, n.1, p.56-59, 2007.

JOHNSON, J. A.; AKERS, W. S. Influence of metabolites on protein binding of verapamil enantiomers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v.39, p. 536-538, 1995.

KAISER, D. G.; VANGIESSEN, G. J.; REISCHER, R. J.; WECHTER, W. J. Isomeric inversion of ibuprofen (R) enantiomer in humans. **Journal of Pharmaceutical Science**, New York, v. 65, p. 269-273, 1976.

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

KENNEDY, G. L, JR; VALENTINE, R. Inhalation toxicology. In: HAYES, A. W. (Ed). **Principles and methods of toxicology**. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 805-838

KIM J.; RIGGS, K. W.; RURAK, D. W. Stereoselective pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in pregnant sheep. **Drug Metab Dispos**, Baltimore, v.32, p.212-221, 2003.

KIM, J.; RIGGS, K. W.; MISRI, S.; KENT, N.; OBERLANDER, T. F.; GRUNAU, R. E.; FITZGERALD, C.; RURAK, D. W. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, v.61, p.155-163, 2005.

KIRK. **Encyclopedia of Chemical Techonology:** 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1980, p. 908.

KLOTZ, U.; AMMON, E. Clinical and Toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. **Eur J Clin Pharmacol**, Germany, v.54, p. 7-12, 1998.

KNIHINICKI, R. D.; WILLIAMS, K. M.; DAY, R. O. Chiral inversion of 2-aryl-propionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs-1. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 38, p. 4389-4395, 1989.

KONDO, J.; SUZUKI, N.; NAGANUMA, H.; IMAOKA, T.; KAWASAKI, T.; NAKANISHI, A.; KAWAHARA, Y. Enantiospecific determination of ibuprofen in rat plasma using chiral fluorescence derivatization reagent, (-)-2 (4-(1-aminoethyl)phenyl)-6-methoxybenzoxazole. **Biomed Chromatogr**, London, v. 8, n.4, p. 170-174, 1994.

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, n. 4, p. 388-392, 1996.

LANKFORD, S. M.; BAI, S. A. Determination of stereochemical composition of the major metabolities of verapamil in dog urine with enantiosselective liquid chromatographic techniques. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 663, p. 91-101, 1995.

LI, D.; HAN, Y.;MENG, X.; SUN, X.; YU, Q.; LI, Y.; WAN, L.; HUO, Y.;GUO, C. Effect of organic solvents on rat P450 activities in rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v.38, n.11, p.1922-1925, 2010.

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

LUCAS, R. A. The human pharmacology of fluoxetine. Int J Obes Relat Metab **Disord**, London, v. 16, p. 49-54, 1992.

MARGOLIS, J. M.; 0'DONNEL, J. P.; MANKOWSKI, D. C.; EKINS, S.; OBACH, R. S. (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine *n*-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 28, p. 1187-1191, 2000.

MATEUS, F. H.; LEPERA, J. S.; MARQUES, M. P.; BORALLI, V. B.; LANCHOTE, V. L. Influence of *n*-hexane inhalation on the enantioselective pharmacokinetics and metabolismo of verapamil in rats. **Chirality**, New York, v.22, p.29-34, 2010.

MATEUS, F. H.; LEPERA, J. S.; MARQUES, M. P.; BORALLI, V. B.; LANCHOTE, V. L. Reduction of enantioselectivity in the kinetic disposition and metabolismo of verapamil in rats exposed to toluene. **Can J P Pharmacol**, Ottawa, v. 86, p. 232-239, 2008.

MATEUS, F. H.; LEPERA, J. S.; MARQUES, M. P.; BORALLI, V. B.; LANCHOTE, V. L. Simultaneous analysis of the enantiomers of verapamil and norverapamil in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v.45, p. 762-768, 2007.

MC CONATHY, J.; OWENS, M. J. Stereochemistry in drug action. **Prim Care Companion J Clin Psychiatry**, Memphis, v. 5, n. 2, p. 70-73, 2003.

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

NEWA, M.; BHANDARI, K. H.; KIM, J. O.; IM, J. S.; KIM, J. A.; YOO, B. K.; WOO, J. S.; CHOI, H. G.; YONG, C. S. Enhancement of solubility, dissolution and bioavailability of ibuprofen in solid dispersion systems. **Chem Pharm Bull**, Tokyo, v. 56, n. 4, p. 569-574, 2008.

OLSEN, B. A.; WIRTH, D. D.; LAREW, J. S. Determination of fluoxetine hydrochloride enantiomeric excess using high performance liquid chromatography with chiral stationary phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 17, p.623-630, 1998.

PAGEL, P. S.; HETTRICK, D. A.; LOWE, D. Cardiovascular effects of verapamil enantiomers combinations in conscious dogs. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 348, p. 213-221, 1998.

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, Reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 744-754, 1998.

RING BJ, ECKSTEIN JA, GILLESPIE JS, BINKLEY SN, VANDENBRANDEN M, WRIGHTON SA. Identification of the human cytochromes P450 responsible for in vitro formation of *R*- and *S*-norfluoxetine. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.297, p.1044-1050, 2001.

RITSCHEL, W. A.; KEARNS, G. L. **Handbook of basic Pharmacokineticsincluding clinical applications:** 5 ed. Washington: An Apha Handbook, 1998, 562 p.

ROBINSON, M. A.; MEHVAR, R. Enantioselective distribution of verapamil and norverapamil into human and rat erythrocytes: the role of plasma proteína binding. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester, v.17, p.577-587, 1996.

RUDY, A. C.; KNIGHT, P. M.; BRATER, D. C.; HALL, S. D. Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: Administration of R-, S- and racemic ibuprofen. **Journal Pharmacol Exp Ther**, Bethesda, v. 259, p. 1133-1139, 1991.

SATTARI, S.; JAMALI, F. Evidence of absorption rate dependency of ibuprofen inversion in the rat. **Chirality**, New York, v. 6, p. 435-439, 1994.

SHEN, Z.; WANG, S.; BAKHTIAR, R. Enantiomeric separation and quantification of fluoxetine (Prozac) in human by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction in 96-well plate format. **Rapid Comm Mass Spectrom**, Chichester, v.16, p.332-338, 2002.

SILVA, E. F. Gestão ambiental dos postos revendedores de combustíveis no estado do Rio de Janeiro: uma visão crítica na visão ocupacional e ambiental na presença do benzeno na gasolina automotiva. 2004. 97f. Dissertação (Mestrado em Gestão Ambiental) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

STAGIN, G.; GILLESPIE, W. R. Simultaneous analysis of verapamil and norverapamil enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 667, p. 349-354, 1995.

STEVENS, J. C.; WRIGHTON, S. A. Interaction of the enantiomer of fluoxetine and norfluoxetine with human liver cytochromes P450. **J Pharmacol Exp. Ther**, Bethesda, v. 266, p. 964-971, 1993.

TAN, S. C.; JACKSON, S. H. D.; SWIFT, C. G.;HUTT, A. J. Enantiospecific analysis of ibuprofen by high performance liquid cromatography: determination of free and total drug enantiomer concentrations in serum and urine. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.46, n. 1, p. 23-32, 1997.

TAN, S. C.; PATEL, B. K.; JACKSON, S. H.; SWIFT, C. G.; HUTT, A. J. Stereoselectivity of ibuprofen metabolism and pharmacokinetics following the administration of the racemate to healthy volunteers. **Xenobiotica**, England, v. 32 (8), p. 683-697, 2002.

TENG, X. W.; WANG, S. W. J.; DAVIES, N. M. Stereospecific high-performance liquid chromatographic analysis of ibuprofen in rat serum. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.796, p. 225-231, 2003.

TRACY, T. S.; KORZEKWA K. R.; GONZALEZ, F. J.; WAINER, I. W. Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. **Br J Clin Pharmacol**, England, v.47, p.545-552, 1999.

UGWOKE, C. C.; NWOBODO, E. D.; UNEKWE, P.; ODIKE, M.; CHUKWUMA, S. T.; AMILO, G. The reproductive dysfunction effects of gasoline inhalation in albino rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, Nigerian, v. 20, p. 54-57, 2005.

UNCETA, N.; BARRONDO, S.; AZUA, I. R.; CABALLERO, A. G.; GOICOLEA, M. A.; SALLES, J.; BARRIO, R. J. Determination of fluoxetine, norfluoxetine and their enantiomers in rat plasma and brain samples by liquid chromatography with fluorescente detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 852, p. 519-528, 2007.

UNITED STATES. National Library of Medicine. **Toxicology Literature Online (Toxline).** Bethesda, 2007. Disponível em: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgibin/sis/htmlgen?TOXLINE. Acesso em: 03 jan. 2008.

UPRETI, V.; EDDINGTON, N. D. Fluoxetine pretreatment effects pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ECSTASY) in rat. **J Pharm Sci**, New York, v. 97, p.1593-1605, 2007.

WONG, D. T.; BYMASTER, F. P.; REID, L. R.; FULLER, R. W.; PERRY, K. W. Inhibition of serotonin uptake by optical isomers of fluoxetine. **Drug Dev Res**, New York, v.6, p.397-403, 1985.

WRIGHT, M. R.; SATTARI, S.; BROCKS, D. R.; JAMALI, F. Improved highperformance liquid chromatographic assay method for the enantiomers of ibuprofen. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 583, p. 259-265, 1992.

YU, L.; LI, F. M.; GUO, X. J. Enantiomeric separation of fluoxetine derivatives onpolysaccharide-based chiral columns. **Arch Pharma Chem Life Sci**, Weinheim, v.339, p. 461-465, 2006.

ZHOU, J.; REN, Q.; WU, P. Chromatographic separation of fluoxetine hydrochloride enantiomers by cellulose chiral stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Monticello, v. 28, p. 3229-3242, 2005.

ZUCCARO, P.; PACIFICI, R.; AVENOSO, A.; PELLEGRINI, M.; SPINA, E.; PERUCCA, E.; PICHINI, S. Issues in methodology and applications for therapeutic drug monitoring of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers. **Therapeutic Drug Monitoring**, Hagerstown, v. 20, p. 20-24, 1998.

# APÊNDICE

Apêndice A - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do verapamil nos animais do grupo controle.



Apêndice B - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do verapamil nos animais do grupo exposto ao etanol.



Apêndice C - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do verapamil nos animais do grupo exposto à gasolina.



Apêndice D - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do norverapamil nos animais do grupo controle.



Apêndice E - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do norverapamil nos animais do grupo exposto ao etanol.



Apêndice F - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do norverapamil nos animais do grupo exposto à gasolina.



Apêndice G - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do ibuprofeno nos animais do grupo controle.



Apêndice H - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do ibuprofeno nos animais do grupo exposto ao etanol.



Apêndice I - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do ibuprofeno nos animais do grupo exposto à gasolina.



Apêndice J - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros da fluoxetina nos animais do grupo controle.



Apêndice L - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros da fluoxetina nos animais do grupo exposto ao etanol.



Apêndice M - Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros da fluoxetina nos animais do grupo exposto à gasolina.



#### **ANEXO**



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



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 39/2008

Interessado: Jucilaine Lauren Cavalcanti Cardoso Orientador: Prof. Dr. José Salvador Lepera Projeto: Influência da exposição crônica a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C9 e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais

#### Parecer nº 43/2009 - Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Influência da exposição crônica a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C9 e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em janeiro de 2012.

Araraquara, 16 de outubro de 2009.

Laasure Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. AURELUCE DEMONTE Coordenadora do CEP