UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo
enantiosseletivos do verapamil em ratos**

Fabiano Henrique Mateus

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo
enantiosseletivos do verapamil em ratos**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Fabiano Henrique Mateus

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote

Ribeirão Preto
2007

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

Mateus, Fabiano Henrique

Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivo do verapamil em ratos. Ribeirão Preto, 2007.

99 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Lanchote, Vera Lucia.

1. Verapamil. 2. Solventes. 3. Enantiômeros. 4. Farmacocinética

Nome do aluno: Fabiano Henrique Mateus

Título do trabalho: Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivos do verapamil em ratos.

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais, William e Sonia, pelo apoio incondicional, pelo esforço, pelo carinho e pela compreensão.

Às minhas irmãs, Tatiane e Gisele, pelo companheirismo e carinho.

À minha sobrinha, Ana Laura, pelos momentos de intensa alegria que passamos juntos.

Aos meus amigos pelo apoio e paciência.

EPÍGRAFE

“Muitos pensam que a pesquisa científica é uma atividade puramente racional, na qual o objetivismo lógico é o único mecanismo capaz de gerar conhecimento. Como resultado os cientistas são vistos como insensíveis e limitados, um grupo de pessoas que corrompe a beleza da Natureza ao analisá-la matematicamente. Essa generalização, como a maioria das generalizações, me parece profundamente injusta, já que ela não incorpora a motivação mais importante do cientista, o seu fascínio pela Natureza e seus mistérios. Que outro motivo justificaria a dedicação de toda uma vida ao estudo de fenômenos, senão uma profunda veneração pela sua beleza? A ciência vai muito além da sua mera prática. Por trás das fórmulas complicadas, das tabelas de dados experimentais e da linguagem técnica, encontra-se uma pessoa tentando transcender as barreiras imediatas da vida diária, guiada por um insaciável desejo de adquirir um nível mais profundo de conhecimento e de realização própria.”

Marcelo Gleiser

(A dança do universo – Dos mitos de criação ao Big-Bang)

GRATIDÃO

“Quem não prefere receber um presente a um tapa?

Agradecer a perdoar? A gratidão é um segundo prazer, que prolonga um primeiro, como um eco de alegria à alegria sentida, como uma felicidade a mais para um mais de felicidade. O que há de mais simples?

A gratidão é um mistério, não pelo prazer que temos com ela, mas pelo obstáculo que com ela vencemos. É a mais agradável das virtudes, e o mais virtuoso dos prazeres.

A gratidão não nos tira nada, ela é dom em troca, mas sem perda e quase sem objeto. A gratidão nada tem a dar...

Agradecer é dar; ser grato é dividir.

A gratidão é dom, a gratidão é partilha, a gratidão é amor: É uma alegria que acompanha a idéia de Ninguém é causa de si, nem, portanto, (em última instância) de sua alegria. Toda série de causas, e há uma infinidade delas, é infinita: tudo se amarra, e nos amarra, e nos atravessa.

Essa gratidão é gratuita, por não se poder exigir dela, ou para ela, nenhum pagamento.

Nenhum homem é causa de si.

A gratidão é nisso o segredo da amizade, não pelo sentimento de uma dívida, pois nada se deve aos amigos, mas por superabundância de alegria comum, de alegria recíproca, de alegria partilhada.”

André Comte-Sponville

(Pequeno Tratado das Grandes Virtudes)

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram na execução desse trabalho, a minha profunda gratidão.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Análise enantiosseletiva do VER e NOR em plasma de ratos	14
3.1.1. Reagentes	14
3.1.2. Preparação das soluções estoque e soluções padrão	14
3.1.2.1. Soluções estoque e soluções padrão de VER e NOR.....	14
3.1.3. Equipamentos	14
3.1.4. Procedimento de extração.....	15
3.2. Validação.....	15
3.2.1. Especificidade	15
3.2.2. Curva de calibração	15
3.2.3. Recuperação	15
3.2.4. Limite de quantificação.....	16
3.2.5. Linearidade.....	16
3.2.6. Precisão do método de análise dos enantiômeros do VER e NOR.....	16
3.2.7. Exatidão	17
3.2.8. Estabilidade	17
3.3. Protocolo experimental.....	18
3.3.1. Câmara de exposição a solventes	18
3.3.1.1. Validação da câmara de exposição.....	23
3.3.1.1.1. Geração da atmosfera padrão.....	23
3.3.1.1.1.1. Verificação do fluxo na entrada da câmara	23
3.3.1.1.1.2. Cálculo da taxa de infusão do solvente	23

3.3.1.1.2. Teste de homogeneidade	23
3.3.1.1.3. Estabilidade	23
3.3.1.1.4. Coleta e análise de solvente no ar	24
3.3.1.1.4.1. Coleta das amostras de ar	24
3.3.1.1.4.2. Análise dos solventes	24
3.3.2. Estudo experimental	24
3.3.2.1. Grupo controle	24
3.3.2.2. - Grupo n-hexano	25
3.3.2.3. - Grupo tolueno	25
3.4. Análise farmacocinética	26
3.5. Análise estatística	26
 4. RESULTADOS	 27
4.1. Especificidade	28
4.2. Curvas de calibração	30
4.3. Recuperação	31
4.4. Limite de quantificação	32
4.5. Linearidade	32
4.6. Precisão e exatidão intra e inter ensaios	33
4.7. Estabilidade	36
4.8. Validação da câmara de exposição	36
4.8.1. Homogeneidade	36
4.8.2. Estabilidade	36
4.9. Análise farmacocinética	38
4.9.1. Grupo controle	38
4.9.2. Grupo n-hexano	41
4.9.3. Grupo tolueno	50
4.9.4. Avaliação da influência da exposição ao n-hexano na farmacocinética estereosseletiva do verapamil e do norverapamil em ratos tratados com VER racêmico	59
4.9.5. Avaliação da influência da exposição ao tolueno na farmacocinética do verapamil e do norverapamil em ratos tratados com VER racêmico	63
 5. DISCUSSÃO	 67

6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXOS	84

RESUMO

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

O verapamil (VER) é um composto quiral comercializado como mistura racêmica dos enantiômeros (+)-(R)-VER e (-)-(S)-VER. O VER é biotransformado em norverapamil (NOR) e em outros metabólitos por vias dependentes do CYP. O tolueno e o n-hexano são solventes orgânicos que podem alterar o metabolismo de medicamentos dependente do CYP. Assim, o estudo investiga a estereosseletividade na farmacocinética do verapamil administrado a ratos na dose de 10 mg kg^{-1} , sob forma racêmica, e do seu metabólito, norverapamil, bem como a influência do n-hexano e do tolueno na disposição cinética dos enantiômeros (+)-(R) e (-)-(S)-VER e (R)- e (S)-norverapamil em animais tratados com os solventes por inalação em câmara de exposição do tipo *nose only* nas concentrações de 88, 176 e 352 mg/m^3 para o n-hexano e 94, 188 e 376 mg/m^3 para o tolueno. Os enantiômeros do VER e do NOR foram separados na coluna de fase quiral Chiralpak® AD e analisados por LC-MS/MS ($m/z = 441,3 \rightarrow 165,5$ para os enantiômeros do norverapamil e $m/z 455,3 \rightarrow 165,5$ para os enantiômeros do verapamil). A análise farmacocinética foi realizada com base no modelo monocompartimental. A farmacocinética do verapamil é estereosseletiva em ratos do grupo controle não tratado com os solventes com acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-VER ($\text{AUC}^{0-\infty} = 250,8 \text{ vs } 120,4 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}$; $P \leq 0,05$, teste de Wilcoxon). O metabólito (S)-NOR também foi acumulado no plasma dos animais do grupo controle com razão S/R relativa ao parâmetro $\text{AUC}^{0-\infty}$ de 1,5. Os parâmetros farmacocinéticos $\text{AUC}^{0-\infty}$, Cl/F, Vd/F e $t_{1/2}$ relativos aos enantiômeros (-)-S e (+)-(R)-VER e aos enantiômeros (S) e (R)-NOR não foram alterados pela exposição em câmara de exposição do tipo *nose only* ao n-hexano nas concentrações de 88, 176 e 352 mg/m^3 e ao tolueno nas concentrações de 94, 188 e 376 mg/m^3 ; teste de Kruskal-Wallis; $P \leq 0,05$. No entanto, a exposição ao n-hexano nas concentrações de 176 mg/m^3 e 352 mg/m^3 e ao tolueno nas concentrações de 94 mg/m^3 , 188 mg/m^3 e 376 mg/m^3 resultou em perda da enantiosseletividade observada para o grupo controle.

Palavras chave: verapamil, norverapamil, enantiômeros, n-hexano, tolueno, câmara de exposição, ratos, farmacocinética.

ABSTRACT

MATEUS, F. H. **Influence of solvents on the kinetic disposition and enantioselective metabolism of verapamil in rats.** 2007. 99 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Verapamil (VER) is a chiral compound which is commercialized as a racemic mixture of the (+)-(R)-VER and (-)-(S)-VER enantiomers. VER is biotransformed into norverapamil (NOR) and other metabolites through CYP-dependent pathways. Toluene and n-hexane are organic solvents that can alter the metabolism of CYP-dependent drugs. The present study investigated the stereoselectivity in the pharmacokinetics of racemic VER administered to rats at a dose of 10 mg kg⁻¹ and of its metabolite NOR. In addition, the influence of n-hexane and toluene on the kinetic disposition of the (+)-(R) and (-)-(S)-VER and (R)- and (S)-NOR enantiomers was analyzed in animals exposed by nose-only inhalation to n-hexane at concentrations of 88, 176 and 352 mg/m³ and to toluene at concentrations of 94, 188 and 376 mg/m³. The VER and NOR enantiomers were separated on a Chiralpak[®] AD chiral phase column and analyzed by LC-MS/MS (*m/z* = 441.3→165.5 for the NOR enantiomers and *m/z* 455.3→165.5 for the VER enantiomers). Pharmacokinetic analysis was performed using a monocompartmental model. The pharmacokinetics of VER was stereoselective in control rats not treated with the solvents, with plasma accumulation of the (-)-(S)-VER eutomer ($AUC^{0-\infty} = 250.8$ vs 120.4 ng mL⁻¹ h; $P \leq 0.05$, Wilcoxon test). The (S)-NOR metabolite was also found to accumulate in plasma of control animals, with an S/R $AUC^{0-\infty}$ ratio of 1.5. The pharmacokinetic parameters $AUC^{0-\infty}$, Cl/F, Vd/F and $t_{1/2}$ obtained for the (-)-S-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR and (R)-NOR enantiomers were not altered by nose-only exposure to n-hexane at concentrations of 88, 176 and 352 mg/m³ or to toluene at concentrations of 94, 188 and 376 mg/m³ ($P \leq 0.05$), Kruskal-Wallis test). However, exposure to 176 and 352 mg/m³ n-hexane and to 94, 188 and 376 mg/m³ toluene resulted in the loss of enantioselectivity observed for the control group.

Key words: verapamil, norverapamil, enantiomers, n-hexane, toluene, exposure chamber, rats, pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do verapamil	5
Figura 2 - Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes	18
Figura 3: Esquema do corte transversal do corpo da câmara de exposição a solventes (plano horizontal).....	19
Figura 4: Esquema do corte transversal do corpo da câmara de exposição a solventes (plano vertical).....	20
Figura 5: Vista superior da câmara de exposição aberta	21
Figura 6: Vista geral da câmara de exposição montada	21
Figura 7: Detalhe do dispositivo de contenção de animal	22
Figura 8: Detalhe do animal sendo exposto na câmara de exposição	22
Figura 9. Espectro de massas dos íons moleculares e dos íons produtos do VER, do NOR e paroxetina.....	28
Figura 10. Análise dos enantiômeros do VER e do NOR em plasma	29
Figura 11. Curva de calibração para o enantiômero (-)-S-VER no intervalo de concentrações plasmáticas de 2,5 – 200,0 ng mL ⁻¹	30
Figura 12. Curva de calibração para o enantiômero (+)-R-VER no intervalo de concentrações plasmáticas de 2,5 – 200,0 ng mL ⁻¹	30
Figura 13. Curvas de calibração para o enantiômero S-NOR no intervalo de concentrações plasmáticas de 2,5 – 200,0 ng mL ⁻¹	31
Figura 14. Curvas de calibração para o enantiômero R-NOR no intervalo de concentrações plasmáticas de 2,5 – 200,0 ng mL ⁻¹	31
Figura 15 Estabilidade dos enantiômeros do VER e NOR em plasma em função do tempo de armazenamento a -70°C	36
Figura 16. Estabilidade da concentração de n-hexano na câmara de exposição. 37	
Figura 17: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo controle (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	38
Figura 18: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 88 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	41

Figura 19: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 176 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	44
Figura 20: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 352 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	47
Figura 21: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 94 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	50
Figura 22: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 188 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	53
Figura 23: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 376 mg/m ³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas	56
Figura 24: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER nos grupos controle, n-hexano 88 mg/m ³ , n-hexano 176 mg/m ³ e n-hexano 352 mg/m ³ . Dados apresentados como medianas.....	59
Figura 25: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do NOR nos grupos controle, n-hexano 88 mg/m ³ , n-hexano 176 mg/m ³ e n-hexano 352 mg/m ³ . Dados apresentados como medianas.....	60
Figura 26: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do VER dos grupos controle, tolueno 94 mg/m ³ , tolueno 188 mg/m ³ mg/m ³ e tolueno 376 mg/m ³ . Dados apresentados como medianas.....	63
Figura 27: Curvas de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo dos enantiômeros do NOR dos grupos controle, tolueno 94 mg/m ³ , tolueno 188 mg/m ³ e tolueno 376 mg/m ³ . Dados apresentados como medianas.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Recuperação absoluta do (-)-S-VER, (+)-R-VER, S-NOR e R-NOR em plasma de ratos.....	32
Tabela 2 - Limites de quantificação para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma	32
Tabela 3 - Linearidade para os enantiômeros do VER e NOR em plasma	33
Tabela 4 - Precisão intra-ensaio para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma	33
Tabela 5 - Precisão inter ensaios para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma	34
Tabela 6 - Exatidão intra - ensaio para a análise estereosseletiva do VER e NOR em plasma	35
Tabela 7 - Exatidão inter ensaios para análise estereosseletiva do VER e NOR em plasma	35
Tabela 8 - Homogeneidade do n-hexano na câmara de exposição a solventes	36
Tabela 9 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	39
Tabela 10 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	40
Tabela 11 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	42
Tabela 12 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95% ...	43
Tabela 13 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	45
Tabela 14 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95% .	46
Tabela 15 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	48
Tabela 16 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%..	49
Tabela 17 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 94 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	51

Tabela 18 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 94 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	52
Tabela 19 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 188 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	54
Tabela 20 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 188 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	55
Tabela 21 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 376 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.....	57
Tabela 22 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 376 mg/m ³ . Dados apresentados como mediana, média e IC 95%	58
Tabela 23 - Avaliação da influência do n-hexano na farmacocinética dos enantiômeros do VER	61
Tabela 24 - Avaliação da influência do n-hexano na farmacocinética dos enantiômeros do NOR.....	62
Tabela 25. Avaliação da influência do tolueno na farmacocinética dos enantiômeros do VER	65
Tabela 26 - Avaliação da influência do tolueno na farmacocinética dos enatiômeros do NOR.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(+)-(R)-VER – enantiômero dextrógeno do verapamil

(-)-(S)-VER – enantiômero levógeno do verapamil

ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists

$AUC^{0-\infty}$ - área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo com extrapolação para o infinito

C_{max} – concentração plasmática máxima

CG – cromatografia gasosa

Cl_t/F – *clearance* total aparente

CYP – sistema citocromo P450

CV – coeficiente de variação

EPM – erro padrão da média

FID – detector por ionização em chama

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IC – intervalo de confiança

k_{el} – constante de velocidade de eliminação

k_a – constante de velocidade de absorção

k_f – constante de velocidade de formação

log – logaritmo

m/z – massa/carga

n – número de amostras analisadas

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – hidróxido de sódio

NOR – norverapamil

PI – padrão interno

R^2 – coeficiente de determinação

(R)-NOR – enantiômero dextrógeno do norverapami

STEL – Short Term Exposure Limit

$t_{1/2a}$ – meia vida de absorção

$t_{1/2}$ – meia vida de eliminação

$t_{1/2f}$ – meia vida de formação

$t_{\max}$ – tempo para atingir $C_{\max}$

TLV – Threshold Limit Value

TWA – Time Weight Average

V_d/F – volume aparente de distribuição

VER – verapamil

X – concentração plasmática teórica

$\bar{y}$ - média das concentrações obtidas

1-INTRODUÇÃO

O conhecimento da disposição cinética e do metabolismo são de grande importância no processo de desenvolvimento de fármacos. Aproximadamente, 30 a 40% dos novos fármacos em desenvolvimento são excluídos nas fases de estudos clínicos por apresentarem propriedades farmacocinéticas desfavoráveis (INGELMAN-SUNDERBERG, 2001).

Atualmente 60 % dos fármacos empregados na clínica são moléculas quirais geralmente disponíveis como racematos. A enantioespecificidade na farmacocinética surge em razão da enantiosseletividade em um ou mais dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. Por sua vez, a enantiosseletividade resulta da interação de fármacos quirais com macromoléculas biológicas quirais (EICHELBaum, 1995; CALDWEL, 1992).

Os avanços nos estudos de metabolismo de fármacos têm permitido a identificação das principais enzimas de fase I e fase II responsáveis pelas conversões metabólicas. O principal desafio da indústria farmacêutica é, no entanto, a extensa variabilidade inter-individual observada na resposta farmacológica. A variabilidade pode resultar em ausência do efeito terapêutico esperado, efeitos adversos ou na manifestação de toxicidade em populações específicas. Uma das principais causas envolvidas na variabilidade da resposta farmacológica refere-se a indução ou inibição do metabolismo de fármacos pela administração concomitante de outros fármacos, fatores ambientais, exposição ocupacional, polimorfismo genético, estados fisiológicos e estados patológicos. Dos fatores relacionados ao metabolismo, a indução e a inibição enzimática podem afetar os enantiômeros de um fármaco quiral em diferentes extensões. No entanto, essas alterações são mais evidentes quando os enantiômeros sofrem biotransformação através de diferentes enzimas ou pelas mesmas enzimas em diferentes velocidades (HUTZLER e TRACY, 2002; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; KARIN, 1996; KROEMER, FROMM e EINCHELBAUM, 1996; MEHVAR e REYNOLDS, 1996).

O sistema enzimático citocromo P450 (CYP) é o principal responsável pela eliminação de fármacos e drogas, poluentes ambientais e outros xenobióticos. Esse sistema consiste de várias isoformas distintas encontradas em altas concentrações no fígado, embora estejam presentes em diferentes tecidos. A principal função do CYP é converter moléculas lipofílicas em compostos mais solúveis em água que podem ser facilmente eliminados do organismo (BUSBY, ACKERMANN e CRESPI 1999).

Recentemente, os conhecimentos obtidos a respeito das bases moleculares para a indução ou inibição do CYP têm obtido grandes progressos. Uma avaliação dos mecanismos de eliminação metabólica de 315 diferentes fármacos revelou que 56% deles são eliminados primariamente pela ação das isoformas do CYP, sendo o CYP3A4 o sistema mais importante, responsável pela eliminação da maioria dos fármacos (50%) seguido pelo CYP2D6 (20%), CYP2C9/19 (15%), CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2 e CYPs não identificados. Todas essas isoformas podem ser induzidas, exceto o CYP2D6, ou inibidas por diferentes substâncias alterando o metabolismo de um fármaco quiral em diferentes extensões. Como exemplos, podem ser citados: o metabolismo da (S)-mefenitoína pelo CYP2C19, uma isoforma preferencialmente induzida pela rifampicina, e o metabolismo do (R)-verapamil preferencialmente inibido pela cimetidina, um clássico inibidor do CYP (HUTZLER e TRACY, 2002; INGELMAN-SUNDERBERG, 2001; BUSBY, ACKERMANN e CRESPI, 1999; KROEMER, FROMM e EICHELBAUM, 1996).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência da hipertensão arterial é bastante elevada e, em alguns países, pode acometer de 15 a 25% da população adulta. Dessa maneira, a hipertensão provoca um impacto relevante na qualidade de vida da população (ZANIDIP, 1999).

O verapamil, 2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[2-(3,4-dimetoxifenil) etil-metil-amino]-2-propan-2-il-pentanonitrila, 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 (ASAFUL-ADJAYE e SHIU, 1998; PAGEL et al, 1998; BHATTI e FOSTER, 1997; JOHNSON et al, 1995; LANKFORD e BAI, 1995; STAGNI e GILLESPIE, 1995).

A farmacocinética do verapamil é enantiosseletiva na administração oral ou intravascular tanto em homens como em ratos. No entanto, as razões enantioméricas de concentrações plasmáticas observadas no rato são opostas às aquelas observadas em estudos clínicos (BHATTI e FOSTER, 1997). Robinson e Mehvar (1996) sugerem que as diferentes razões enantioméricas observadas entre o homem e o rato são conseqüência da estereosseletividade oposta na ligação do fármaco às proteínas plasmáticas. As frações livres dos enantiômeros (-)-(S)-VER e

(S)-NOR são maiores em plasma humano enquanto as frações livres do (+)-(R)-VER e (R)-NOR são maiores no rato (BHATTI e FOSTER, 1997).

Bhatti e Foster (1997) avaliaram a farmacocinética e a biodisponibilidade dos enantiômeros do VER em ratos após a administração de dose única de cloridrato de verapamil racêmico por via intravenosa e por via oral. Os *clearances* do (+)-(R)-VER foram maiores do que aqueles do (-)-(S)-VER em ratos tratados com verapamil racêmico por via intravascular (2,1 vs 1,4 L.h⁻¹.kg) ou oral (53,3 vs 21,0 L.h⁻¹.kg). A biodisponibilidade oral do (-)-(S)-VER é maior que a do (+)-(R)-VER (7,4 vs 4,1 %) em ratos, sugerindo extensa eliminação pré-sistêmica de ambos os enantiômeros. O volume de distribuição (Vd) para os enantiômeros do VER também exibe estereosseletividade em ratos. Os valores do Vd do (+)-(R)-VER são 58% maiores que o do (-)-(S)-VER (5,2 vs 3,3 L. kg⁻¹) na administração intravascular (BHATTI e FOSTER, 1997).

Estudos com microssomos humanos e de ratos indicaram similaridades na produção de metabólitos. Em microssomas de fígado humano o metabolismo do verapamil é dependente do CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C18, CYP2D6 e CYP2E1 (WALLES, 2001; BHATTI e FOSTER, 1997). Vários estudos descrevem o metabolismo do VER em ratos sem, no entanto, avaliar as enzimas envolvidas no processo (BORLAK, 2005; SUN, ZHANG e ZHONG, 2004; WALLES, 2003; WALLES, 2001). Em microssomas de fígado de ratos a O-desmetilação e a N-desalquilação representam as principais vias metabólicas sendo que a proporção relativa destas vias depende da concentração do VER. O VER quando presente em baixas concentrações (1μmol/L) é biotransformado em 8 metabólitos (Figura 1) (SUN, ZHANG e ZHONG, 2004).

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 do verapamil. 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. A atividade do norverapamil como vasodilatador coronariano representa 20% da atividade do verapamil. Embora menos potente que o verapamil e até mesmo que o norverapamil, o D-617 diminui a contração cardíaca, enquanto o D-620 é capaz de diminuir a condução atrioventricular (BRANDSTETEROVÁ e WAINER, 1999; DILGER et al,

1999; TRACY et al, 1999; DARBAR et al;1998; LANKFORD e BAI, 1995, SHIBUKAWA e WAINER, 1992).

Figura 1. Metabolismo do verapamil em microssomos de fígado de ratos (SUN, 2005)

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 à 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).

Embora existam poucos estudos na literatura, recentemente tem aumentado a atenção aos efeitos dos solventes orgânicos na atividade do CYP em razão da importância dessas enzimas no metabolismo de medicamentos. O metanol, o dimetilsulfóxido e a acetonitrila, quando excedem a concentração de 1% (v/v) são inibidores ou indutores do metabolismo, mediado pelo CYP, de diversos substratos. Na concentração de 1%, o metanol inibe em 25% a atividade do CYP1A1 e CYP2D6 e em 19 e 12%, respectivamente, a atividade do CYP2B6 e CYP2C9. A administração oral de xileno a ratos aumenta a atividade dos CYP1A, CYP2B e CYP3A (TANG et al, 2000; BUSBY et al, 1999; LEHMAN-McKEEMAN, 1999). Estudos de Nakajima e Wangl (1994), demonstram que a exposição ao tolueno induz os CYP2B1/2, CYP2E1 e CYP3A1 e inibe os CYP2C11/6 e CYP2A1 em ratos machos adultos. De acordo com os dados do autor, tanto a idade quanto o gênero influenciam na indução dos CYP promovida pelo tolueno. Assim, observou-se que a indução é mais característica em animais jovens e machos.

O tolueno é um solvente empregado como matéria prima na produção de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), ácido benzóico, cloreto de benzila e tolueno diisocianato (TDI). É também usado em larga escala como solvente na produção de tintas, vernizes, adesivos e seus tóxicos, além de estar presente em muitos produtos de uso doméstico como desinfetantes, removedores, inibidores de ferrugem e aerossóis. O Instituto Nacional de Segurança Ocupacional e Saúde dos EUA estimou que 1.278.000 trabalhadores foram expostos ao tolueno no período de 1981 a 1983, nesse país. O tolueno é um solvente altamente volátil absorvido pelo trato respiratório, sendo encontrado na circulação dentro de 10 segundos após a exposição inicial. Aproximadamente, 80% da dose inalada é absorvida observando-se uma diminuição da absorção após exposição continuada. De acordo com o coeficiente de partição log octanol/água, o tolueno acumula no tecido adiposo. A absorção oral do tolueno é mais lenta que a absorção pulmonar alcançando picos de concentrações plasmáticas de 2-3 h após dose oral única comparado a 20-30 minutos após a exposição por inalação de 100 ppm. (ROBERTS et al, 2006; LEITE, 2003; HASS et al, 1999; BRUCKNER e WARREN, 1996).

Aproximadamente, 18 % do tolueno absorvido é eliminado pelo ar expirado. Em camundongos, o tolueno é eliminado do ar alveolar com meia-vida de 2,6 h. A eliminação do sangue e do cérebro ocorre com meia-vida de 1,0 h. Em ratos, a meia-vida do tolueno, após a inalação de 1000 a 3000 ppm, é de 34 minutos e as

meias-vidas para as fases de eliminação rápida e lenta são de 6 e 90 minutos, respectivamente. As concentrações alveolar e sangüínea do tolueno decrescem, como uma função direta das razões respiratória e cardíaca após o fim da exposição. A meia-vida de eliminação do tolueno do tecido adiposo humano é de 0,5 a 2,7 h após inalação de 70 ppm por 2 h (LEITE, 2003; BRUCKNER e WARREN, 1996).

O tolueno é metabolizado pelo CYP a álcool benzílico o qual é rapidamente convertido a ácido benzóico via benzaldeído sendo excretado na urina como ácido hipúrico. A incubação de tolueno com NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e microsossomos hepáticos de ratos Wistar, preparados de animais previamente tratados com etanol (indutor do CYP2E1), ou que receberam fenobarbital (indutor do CYP2B) demonstrou que o álcool benzílico foi o principal metabólito. Os derivados *o* - e *p*-cresol compreendem 1,1 a 1,5% e 1,7 a 2,8%, respectivamente, do total de metabólitos. O pré-tratamento com etanol tem pouco efeito nas porcentagens relativas dos três metabólitos, mas a indução por fenobarbital aumenta os valores do *o* - e *p*-cresol para 5,5 e 8,0%, respectivamente. Estudos com microsossomos de fígado humano demonstram que o CYP2E1 é o principal sistema envolvido na formação do álcool benzílico, seguido pelo CYP2B6, CYP2C8, CYP1A2 e CYP1A1, nesta ordem. A formação do *o*-cresol e *p*-cresol como metabólitos secundários também deriva da atividade do CYP. Os CYP2B6 e CYP2E1 catalisam a formação do *p*-cresol enquanto o CYP1A2 catalisa a formação de ambos *o* - e *p*-cresol (LEITE, 2003; NAKAJIMA et al, 1997; BRUCKNER e WARREN, 1996).

A exposição aos vapores de tolueno aumenta a atividade das enzimas hepáticas microsossomais de animais aumentando o metabolismo de fármacos como a antipirina. No entanto, em humanos o *clearance* salivar do fármaco está inalterado em trabalhadores expostos aos vapores de tolueno na concentração de 100 ppm durante 6,5 h quando comparado com o *clearance* da antipirina em trabalhadores não expostos (DOSSING, 1983).

A ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) (2006) recomenda um TLV-TWA[®] (*Threshold Limit Value-Time Weight Average*) de 50 ppm (188 mg/m³) para as exposições ocupacionais ao tolueno com o objetivo de minimizar o potencial risco da manifestação de dor de cabeça, irritação dos olhos e do trato respiratório superior, sonolência, tonturas, aumento do tempo de reação e outros sintomas decorrentes da depressão do SNC. Os TLV-TWA variam de 25 ppm

(95 mg/m³) na Noruega e na Dinamarca, 50 ppm na União Européia e Bélgica, 78 ppm (290 mg/m³) no Brasil e 99,7 ppm (375 mg/m³) na França. Embora seja considerado um poluente do ar (níveis atmosféricos menores que 1 ppm), o tolueno não parece ser contaminante de alimentos e da água potável já que é rapidamente biodegradável e não tende a ser bioacumulado no meio ambiente (ACGIH, 2006).

Vários estudos relativos à inalação do tolueno tem sido realizados em animais para avaliar a toxicidade no desenvolvimento. A inalação do tolueno durante a gestação em ratos e camundongos parece retardar o desenvolvimento pré-natal e esquelético (ACGIH, 2006).

Em humanos, casos de recém nascidos com baixo peso, microcefalia e anormalidades faciais tem sido descritos em crianças nascidas de mulheres que inalaram, abusivamente, tolueno durante a gravidez. Outros efeitos no homem incluem disfunção crônica do SNC e perda auditiva decorrente da exposição ocupacional. Embora a exposição humana ao tolueno como droga de abuso seja reportada como causa de malformações, o risco potencial em exposições abaixo dos limites ocupacionais no mundo (TLV-TWA 25-200 ppm) ainda é pouco claro. (ROBERTS, 2007; TSUGA e HONMA, 2000; CAMPO et al, 1999; HASS et al, 1999; NAKAJIMA et al, 1997).

A exposição de ratos ao tolueno em altas concentrações resulta em ataxia e diminuição de ganho de peso, sintomas que aumentam com o aumento da dose. (ROBERTS et al, 2007).

O n-hexano é um solvente orgânico empregado em indústrias de calçados, indústria química e em laboratórios de pesquisa. O n-hexano comercial é uma mistura dos isômeros do hexano com pequenas quantidades de ciclopentano, ciclohexano, pentano e heptano. É um solvente amplamente absorvido pelos pulmões e trato gastrointestinal. A retenção pulmonar do n-hexano inalado pode variar de 5% a 28% dependendo da magnitude da exposição. A exposição de ratos a concentrações 1.000 e 10.000 ppm resulta em um platô nos níveis de n-hexano que é alcançado em 30 min no sangue e em 2 h em outros tecidos (fígado, rins, intestino, testículos e cérebro). Na exposição a 50.000 ppm por mais de 10 h, a concentração de n-hexano no fígado aumenta com o tempo, mas o estado de equilíbrio não é alcançado. No entanto, nos rins, adrenais, sangue, cérebro e pulmões os níveis de n-hexano alcançam o estado de equilíbrio em, aproximadamente, 5 h após a exposição. A exposição a altas concentrações de n-

hexano resulta em acúmulo de lipídeos no fígado o que pode ser responsável pela não saturação do fígado pelo n-hexano devido à alta lipossolubilidade do solvente. A eliminação do n-hexano do sangue e cérebro de ratos é descrita como sendo rápida e multifásica, com respectivas meias-vidas de 7 min e de 1 a 2 h (ACGIH, 2206).

O metabolismo do n-hexano requer vários passos intermediários em que são produzidos os metabólitos 2-hexanona, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2,5-hexanodiol, 5-hidroxi-2-hexanona, γ -valerolactona, além da 2,5-hexanodiona. O 2-hexanol é o principal metabólito urinário excretado por ratos durante a exposição, por inalação, por mais de 24 h, do n-hexano. Após a exposição, os principais metabólitos na urina são a 2,5-hexanodiona, 2,5-dimetilfurano e γ -valerolactona. Com exposição prolongada (3h/dia, por 33 semanas) a 500 ppm, 80 a 90% de todos os metabólitos urinários são conjugados, sendo o 2-hexanol e a 2,5-hexanodiona os metabólitos predominantes. As meias-vidas de eliminação dos metabólitos na urina de ratos são descritas como 4 h para a hexanona, 7 h para o 3-hexanol e 2,5-hexanodiona, 11 a 14 h para o 2,5-dimetilfurano e γ -valerolactona e 18 h para o 2-hexanol (ACGIH, 2006, SANTOS, PASSARELI e NASCIMENTO, 2002; MANINI et al, 1999, CROSBIE et al, 1997; SORIANO et al, 1996).

A exposição ocupacional ao hexano pode causar quadros de neuropatia central e periférica. O metabólito 2,5-hexanodiona parece ser o principal responsável pela neurotoxicidade na exposição ao solvente. O mecanismo de toxicidade ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que o 2,5-hexanodiona seja capaz de causar desorganização axonal resultando na degeneração do nervo (CROSBIE et al, 1997; SORIANO et al, 1996).

A produção do metabólito neurotóxico a partir do precursor 2-hexanol, ocorre por via dependente do CYP2B6 da mesma maneira que a produção do 2- e 3-hexanol ocorre por via dependente do CYP2B1. Um acentuado aumento nos níveis sangüíneos de 2,5-hexanodiona pode ser observado na exposição a 900 ppm por 6 a 24 h. Não há evidências de acúmulo da 2,5-hexanodiona em sangue de ratos após a exposição a 900 ppm de n-hexano 8h/dia por 9 dias. A 2,5-hexanodiona é completamente eliminada do sangue de ratos até 6,3 h após o término da exposição a 900 ppm, 8h/dia durante 72 dias.

A exposição de ratos durante 5 h/dia, 5 dias/semana por 1 a 6 meses à concentração de 2000 ppm do hexano comercial (46% de n-hexano) evidencia a

neurotoxicidade causada pelo solvente. Sinais de neurotoxicidade também foram observados quando camundongos inalaram n-hexano 24 h/dia, 6 dias/semana durante 1 ano na dose de 250 ppm. A inalação de 100 ppm durante 7 meses não demonstrou polineuropatia periférica (ACGIH, 2006).

A neurotoxicidade do n-hexano não é observada nos outros isômeros do hexano. A polineuropatia tem resultado de exposições inferiores a 500 ppm. Exposições repetidas de ratos a 250 ppm têm causado efeitos neurotóxicos (ACGIH, 2006).

Em virtude dos estudos realizados empregarem hexano comercial que continha apenas 30 % de n-hexano, um limite TLV-TWA[®] de 25 ppm foi proposto em 1979. No entanto, uma revisão detalhada das referências levou a conclusão que na maioria das situações os solventes continham de 50 a 70 % de n-hexano. Dessa maneira, um TLV-TWA[®] de 50 ppm é recomendado para o n-hexano. O limite recomendado visa minimizar o risco potencial da manifestação de efeitos neurotóxicos, narcose e irritação dos olhos e membranas mucosas (ACGIH, 2006; VOHRA e GAIND, 1992).

Embora estejam descritos na literatura vários estudos sobre os efeitos tóxicos desses solventes na saúde do trabalhador e em animais de experimentação, pouco se sabe sobre os efeitos dessas substâncias na atividade do CYP e, conseqüentemente, no metabolismo de medicamentos quirais dependente desse sistema enzimático. Dessa maneira, o estudo visa investigar a influência do tolueno e do n-hexano na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do verapamil administrado sob forma racêmica a ratos.

2. OBJETIVOS

1-Desenvolver e validar método de análise dos enantiômeros (+)-(R) e (-)-(S)-verapamil, e (R) e (S)-norverapamil em plasma de ratos com aplicação em estudos de disposição cinética e metabolismo.

2-Investigar a disposição cinética e o metabolismo estereosseletivos do verapamil administrado a ratos sob forma racêmica.

3-Investigar a influência do tolueno na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do verapamil em ratos tratados com os vapores do solvente, por inalação, em câmara de exposição.

4-Investigar a influência do n-hexano na disposição cinética e metabolismo estereosseletivos do verapamil em ratos tratados com os vapores do solvente, por inalação, em câmara de exposição.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise enantiosseletiva do VER e NOR em plasma de ratos

3.1.1. Reagentes

O cloridrato de ($\pm$)-verapamil (99,4%), o cloridrato de R-(+)-verapamil e o desmetil-($\pm$)-verapamil (norverapamil) foram provenientes da Sigma (St. Louis, EUA). A paroxetina, empregada como padrão interno, foi gentilmente cedida pela Eurofarma Laboratórios Ltda (São Paulo, Brasil). A dietilamina e o hidróxido de sódio, todos grau analítico, foram Merck (Darmstadt, Alemanha), enquanto o n-hexano, isopropanol, metanol, o dissulfeto de carbono, o o-xileno e o etanol, todos grau HPLC, foram EM Science, Merck (Darmstadt, Alemanha). Toda água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA).

3.1.2. Preparação das soluções estoque e soluções padrão

3.1.2.1. Soluções estoque e soluções padrão de VER e NOR

As soluções estoque de cloridrato de verapamil racêmico (VER), norverapamil racêmico (NOR) e do padrão interno (PI), paroxetina, foram preparadas em metanol, nas concentrações de 0,2 mg mL⁻¹ para o VER e NOR e 1,0 mg mL⁻¹ para a paroxetina. A partir dessas soluções foram preparadas as soluções padrão nas concentrações 1600, 800, 400, 200, 80, 40, 20 e 8 ng de VER e NOR racêmicos por mL de metanol e 5 ng de paroxetina por mL de metanol.

3.1.3. Equipamentos

O sistema HPLC empregado na análise do VER e do NOR foi constituído por um cromatógrafo Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) composto por uma bomba modelo LC-10 ADVP e um detector por espectrometria de massas Micromass[®] (Reino Unido) modelo Quattro Micro[™] operando com energia de capilar, energia de cone, energia de extrator, temperatura da fonte e temperatura de dessolvatação em, respectivamente, 4 kV, 40 V, 2 V, 100 °C e 200 °C. Para registrar e integrar os picos foi empregado o *software* MassLynx[®] versão 3.5. A separação cromatográfica do VER e do NOR foi obtida em coluna de fase quiral Chiralpak[®] AD (Daicel Chemical Industries LTD., Exton, EUA) com partículas de 10 μ m (250 X 4 mm) protegida por coluna de guarda CN Lichrospher[®] 100, partículas de 5 μ m, (4 X 4 mm). A fase móvel que eluiu pelo sistema foi composta de n-hexano : isopropanol : etanol : dietilamina

(88:6:6:0,1) (v/v/v/v), na vazão de 1,35 mL/min e infusão pós-coluna de solução composta de etanol:água (95:5) e acetato de amônio 20 mM. 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 m/z (massa/carga): 330,3→192,6 para a paroxetina, 441,3→165,5 para os enantiômeros do norverapamil e m/z 455,3→165,5 para os enantiômeros do verapamil.

3.1.4. Procedimento de extração

Alíquotas de 100 μL de plasma foram fortificadas com 25 μL de solução de PI, 25 μL de solução de NaOH 2 mol.L⁻¹ e 2 mL de n-hexano. Após agitação durante 2 min em agitador tipo *mixer* e centrifugação por 10 min (1800 rpm), as fases orgânicas foram transferidas para tubos cônicos e evaporadas a vácuo até a secura.

3.2. Validação

O método foi validado com base nos parâmetros analíticos especificidade, recuperação, linearidade, precisão e exatidão intra e inter-ensaios, limite de quantificação e estabilidade (CAUSON, 1997; BRESSOLE et al, 1996).

3.2.1. Especificidade

Amostras de plasma branco normais e amostras de plasma branco hemolisadas foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.1.4 e analisadas de acordo com o método descrito.

3.2.2. Curva de calibração

Amostras de plasma branco (100 μL) fortificadas com 25 μL de cada uma das soluções padrão descritas no item 3.2.1 foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica especificados pelo presente estudo. As razões de áreas, padrão/PI, foram plotadas em função das concentrações para o cálculo das equações de regressão linear e dos coeficientes de determinação (1,0 – 200,0 ng de cada enantiômero do verapamil e norverapamil por mL de plasma).

3.2.3. Recuperação

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

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

Amostras de plasma fortificadas com soluções padrão de VER e NOR (1,0; 10 e 100 ng de cada enantiômero/mL de plasma) foram submetidas ao procedimento de extração descrito no item 3.4 e posteriormente adicionadas de PI. As concentrações dessas amostras foram calculadas com base nas áreas obtidas das soluções padrão de VER e NOR não submetidas ao procedimento de extração, empregando-se a equação descrita acima.

3.2.4. Limite de quantificação

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

Para se determinar essa concentração, foram construídas curvas de calibração para cada analito como descrito no item 3.2.2, incluindo-se nas mesmas duas novas concentrações menores de VER e NOR correspondentes às concentrações plasmáticas de 2,0 e 1,0 ng mL⁻¹ de cada enantiômero do VER e NOR, analisadas em triplicata.

3.2.5. Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas de calibração para cada um dos analitos a serem analisados, como descrito no item 3.2.2, incluindo-se nas mesmas, duas novas concentrações crescentes 250 e 500 ng mL⁻¹ de plasma para cada enantiômero do VER e NOR, analisadas em triplicata.

3.2.6. Precisão do método de análise dos enantiômeros do VER e NOR

Amostras de 10 mL de plasma branco foram fortificadas com soluções padrão de VER e NOR para a obtenção de soluções nas concentrações de 1,0; 10,0 e 100,0 ng de cada enantiômero por mL de plasma.

Na avaliação da precisão intra-ensaio, dez alíquotas de 100 µL de cada uma dessas três soluções foram submetidas aos procedimentos de extração e análise cromatográfica descritos sendo, posteriormente analisadas com base em uma curva de calibração.

Já para a avaliação da precisão inter ensaios, alíquotas, também de 100 µL, dessas três soluções foram analisadas durante cinco dias consecutivos, com base em curvas de calibração construídas simultaneamente com a análise das amostras.

3.2.7. Exatidão

Exatidão é a concordância entre o valor real do fármaco na amostra e o valor obtido pelo método analítico sendo expressa em porcentagem como erro sistemático, o qual não deve ser superior a 20%.

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

Para os estudos da exatidão, foram analisadas amostras de plasma contendo VER e NOR nas concentrações 1,0; 10,0 e 100,0 ng mL⁻¹ de cada enantiômero,

O erro sistemático foi calculado empregando-se a equação abaixo:

$$\text{Erro Sistemático} = \frac{(\text{Valor obtido} - \text{Valor real})}{\text{Valor real}} \times 100$$

3.2.8. Estabilidade

Para os estudos de estabilidade, um *pool* de plasma branco foi enriquecido de soluções padrão para a obtenção de uma amostra na concentração de 25 ng mL⁻¹ de plasma para cada enantiômero do VER e do NOR. A amostra foi dividida em 11 alíquotas que foram armazenadas a -70°C. Após 1 dia uma alíquota foi descongelada e analisada de acordo com o método descrito. O mesmo procedimento foi repetido com as outras alíquotas após 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de congelamento. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas.

3.3. Protocolo experimental

3.3.1. Câmara de exposição a solventes

Os animais foram expostos ao ar ambiente ou aos vapores de solventes em câmara de exposição do tipo “apenas pelo nariz” (*nose only exposure system*), construída na Oficina de Precisão do Campus de Ribeirão Preto-USP.

A câmara foi construída em aço inoxidável, com onze portas, operando em fluxo contínuo passante. O equipamento constitui-se de duas câmaras circulares concêntricas: uma interna que recebe a atmosfera em teste e a distribui às portas, e uma externa, que recebe o material não inalado, assim como os gases exalados pelos animais, e os conduzem à exaustão. A geometria do sistema permite a detecção visual da ocorrência de alterações da atmosfera, como condensação e precipitação. A amostragem da atmosfera é feita nas portas e, durante um experimento, os narizes dos animais e o amostrador situam-se no mesmo plano horizontal, evitando tanto a exposição não uniforme como sua avaliação irreal, devidos a eventuais gradientes de concentração. As Figuras 2-8 ilustram a construção e o funcionamento da câmara de exposição a solventes.

Figura 2. Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes

Figura 3. Esquema do corte transversal do corpo da câmara de exposição à solventes (plano horizontal). (1) Câmara interna – alimentação do vapor, (2) Câmara externa – exaustão, (3) Cone para conexão dos dispositivos de contenção dos animais, (4) Tubo para levar os vapores à zona respiratória do animal, (5) Tirante de fixação da tampa da câmara externa, (6) Furos para fixação de suporte para dispositivo de contenção dos animais.

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

Figura 5. Vista superior da câmara de exposição aberta.

Figura 6. Vista geral da câmara de exposição montada.

Figura 7. Detalhe do dispositivo de contenção de animal.

Figura 8. Detalhe do animal sendo exposto na câmara de exposição.

3.3.1.1. Validação da câmara de exposição

3.3.1.1.1. Geração da atmosfera padrão

3.3.1.1.1.1. Verificação do fluxo na entrada da câmara

O fluxo de ar na entrada da câmara foi medido utilizando um fluxímetro de bolha, com capacidade de 1 litro entre as marcas inicial e final do tubo graduado, e um cronômetro com precisão de 0,01 segundo (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA).

3.3.1.1.1.2. Cálculo da taxa de infusão do solvente

A taxa de infusão de solvente, para obtenção da concentração desejada na câmara de exposição, foi calculada empregando-se a seguinte equação:

$$\text{Taxa de infusão (uL/min)} = ((m/d) \times \text{fluxo})/1000$$

Onde:

m= massa de solvente por m³ de ar

d= densidade do solvente

fluxo= fluxo de ar na entrada da câmara, em litros por minuto (LPM).

A injeção do solvente foi realizada diretamente na corrente de ar, através de uma bomba de infusão Insight[®] Modelo B (Ribeirão Preto, Brasil), programada para injetar o solvente de acordo com a taxa de infusão calculada.

3.3.1.1.2. Teste de homogeneidade

A homogeneidade da distribuição da atmosfera padrão nas portas da câmara de exposição foi verificada utilizando-se atmosferas de n-hexano a 50,4 e 116 mg/m³, através da coleta de amostras de uma hora de duração, simultaneamente, em seis portas não consecutivas da câmara. A coleta de ar e a análise das amostras foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1.1.4.1.

3.3.1.1.3. Estabilidade

A estabilidade da atmosfera na câmara de exposição, ao longo do tempo, foi testada com uma atmosfera de n-hexano a 210 mg/m³, durante 6 horas de ensaio, através da coleta de 6 amostras consecutivas de uma hora cada tomadas simultaneamente em duas portas não contíguas da câmara, totalizando 12 amostras. A coleta de ar e a análise das amostras foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1.1.4.1.

3.3.1.1.4. Coleta e análise de solvente no ar

3.3.1.1.4.1. Coleta das amostras de ar

As amostras foram coletadas em tubos adsorventes de carvão 100/50 mg SKC[®], (Eighty Four, PA, EUA) empregando bombas de amostragem com controle de fluxo microprocessado SKC[®] Modelo Pocket Pump (Eighty Four, PA, USA) operando na vazão de 50 mL/min. Para posicionar os tubos de coleta de modo similar aos narizes dos animais durante os experimentos, eles foram encaixados em rolhas de dimensões adequadas, perfuradas no centro, e acopladas às portas de exposição por encaixe, da mesma forma que os contentores dos animais. Após as coletas os tubos foram fechados com tampas apropriadas e conservados a -15° C, por período não superior a 20 dias.

3.3.1.1.4.2. Análise dos solventes

Para a análise, os tubos coletores foram abertos transferindo-se a seção frontal do meio de coleta (100 mg) para *vial* com septo protegido por teflon SKC[®] (Eighty Four, PA, EUA). A cada amostra foi adicionado 1 mL de dissulfeto de carbono contendo 1 µL/mL de o-xileno como padrão interno aguardando-se um mínimo de 30 minutos para dessorção, com agitação ocasional.

A análise dos solventes foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP de acordo com a metodologia descrita por Lepera e Colacioppo (2005).

3.3.2. Estudo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Protocolo - CEP/FCF/Car nº 16/2004 - Anexo 1)

Foram utilizados ratos machos, Wistar, de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Antes dos experimentos, os animais permaneceram durante 3 dias no biotério da disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara para adaptação, com livre acesso a ração e água.

3.3.2.1. Grupo controle

Os animais foram expostos ao ar ambiente na câmara de exposição, 6 horas por dia, durante 4 dias. Os animais receberam no quinto dia, em estado de jejum de 12 h, por via oral (gavagem) cloridrato de verapamil racêmico dissolvido em água,

Knoll Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Rio de Janeiro, Brasil), na dose de 10 mg kg^{-1} . Os animais foram mantidos na câmara de exposição durante as coletas de amostras de sangue, de $500 \text{ }\mu\text{L}$, nos tempos zero, 15 e 30 minutos e 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0 e 6,0 horas. A heparina (Liquemine® Roche, Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil) foi utilizada como anticoagulante. De cada animal, foram coletadas três amostras em diferentes tempos ($n=6$ para cada tempo) através da excisão de cerca de 0,3 mm da porção distal da cauda, após vasodilatação por aquecimento localizado a 42°C . Após a última coleta os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono. Os plasmas obtidos, após centrifugação das amostras, foram armazenados a -70°C até a análise do VER e NOR.

3.3.2.2. Grupo n-hexano: os animais foram tratados com vapor de n-hexano 99,99% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por inalação em câmara de exposição nas concentrações de 88 mg/m^3 ($0,5 \times \text{LEO}$), 176 mg/m^3 ($1 \times \text{LEO}$) e 352 mg/m^3 ($2 \times \text{LEO}$), 6 h por dia, durante 4 dias seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle. No quinto dia os animais receberam, por gavagem, verapamil racêmico na dose de 10 mg kg^{-1} sendo mantidos na câmara durante o período de coleta de sangue. As amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o descrito para o grupo controle. Foram utilizados 6 animais para cada tempo de colheita.

3.3.2.3. Grupo tolueno: os animais foram tratados com vapor de tolueno 99,99% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por inalação em câmara de exposição nas concentrações de 94 mg/m^3 ($0,5 \times \text{LEO}$), 188 mg/m^3 ($1 \times \text{LEO}$) e 376 mg/m^3 ($2 \times \text{LEO}$) 6 h por dia, durante 4 dias seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle. No quinto dia os animais receberam, por gavagem, verapamil racêmico na dose de 10 mg kg^{-1} sendo mantidos na câmara durante o período de coleta de sangue. As amostras de sangue foram colhidas e armazenadas de acordo com o descrito para o grupo controle. Foram utilizados 6 animais para cada tempo de colheita.

3.4. Análise Farmacocinética

A disposição cinética do (+)-(R)-VER, (-)-(S)-VER, (R)-NOR e S-NOR foi avaliada através do modelo monocompartimental e cinética de primeira ordem utilizando-se o *software* WinNonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, EUA), versão 4.0.

Os dados de concentrações plasmáticas *versus* tempo foram analisados por metodologia compartimental, considerando a absorção e a eliminação como processos de primeira ordem e com inclusão de *lag time* (t_{lag}) na absorção. O parâmetro $C(t)$ foi definido como a última concentração plasmática quantificada. O parâmetro C_{max} foi definido como a concentração plasmática máxima e t_{max} como o tempo para ocorrer a C_{max} .

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

O *software* gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos. As estimativas finais incluíram a constante de velocidade de absorção (k_a), a constante de velocidade de eliminação (k_{el}), o volume aparente de distribuição (Vd/F), o t_{lag} , a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e o *clearance* total aparente (Cl/F). Os parâmetros C_{max} e t_{max} foram calculados utilizando-se as equações padrão do *software*.

3.5. Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o emprego do Graphpad Instat[®] versão 3.0 para obtenção da mediana, média, erro padrão da média (EPM) e intervalo de confiança (IC 95%). As razões enantioméricas diferentes da unidade foram avaliadas dentro do grupo com auxílio do teste de Wilcoxon para dados pareados com nível de significância de 5%.

A comparação de dados entre os grupos controle, n-hexano e tolueno foi analisada com auxílio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

4. RESULTADOS

4.1. Especificidade

A Figura 9 mostra os íons moleculares e os íons produtos do VER, NOR e da paroxetina. A Figura 10 mostra os cromatogramas da análise do plasma branco hemolisado de ratos e dos enantiômeros do verapamil e do seu metabólito norverapamil em plasma de ratos.

Figura 9. Espectro de massas, respectivamente dos íons moleculares e dos íons produtos do VER (A e B), NOR (C e D) e paroxetina (E e F).

Figura 10. Análise dos enantiômeros do VER e do NOR em plasma. Cromatogramas referentes a: (A) amostra de plasma branco hemolisado, (B) amostra de plasma fortificado com VER e NOR e (C) amostra de plasma de animal tratado com VER racêmico . (1) (-)-(S)-VER; (2) (+)-(R)-VER; (3) paroxetina (PI); (4) (S)-NOR; (5) (R)-NOR.

4.2. Curvas de Calibração

. As Figuras 11, 12, 13 e 14 mostram as curvas de calibração para os enantiômeros (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR, respectivamente

Figura 11. Curva de calibração para o enantiômero (-)-S-VER no intervalo de concentrações plasmáticas de 1,0 – 200,0 ng mL⁻¹.

Figura 12. Curva de calibração para o enantiômero (+)-R-VER no intervalo de concentrações plasmáticas de 1,0 – 200,0 ng mL⁻¹.

Figura 13. Curvas de calibração para o enantiômero S-NOR no intervalo de concentrações plasmáticas de 1,0 – 200,0 ng mL⁻¹.

Figura 14. Curvas de calibração para o enantiômero R-NOR no intervalo de concentrações plasmáticas de 1,0 – 200,0 ng mL⁻¹.

4.3. Recuperação

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nos testes de avaliação da recuperação absoluta dos enantiômeros do VER e do NOR.

Tabela 1 - Recuperação absoluta do (-)-S-VER, (+)-R-VER, S-NOR e R-NOR em plasma de ratos.

Fármaco	Concentração (ng.mL ⁻¹)	Recuperação (%)	CV (%)
(-)-(S)-VER (n = 3)	1,0	97,2	2,0
	10,0	83,8	3,1
	100,0	99,2	1,0
(+)-(R)-VER (n = 3)	1,0	86,4	1,3
	10,0	77,5	3,2
	100,0	91,3	7,7
(S)-NOR (n = 3)	1,0	71,3	9,7
	10,0	74,6	2,5
	100,0	76,1	9,9
(R)-NOR (n = 3)	1,0	71,0	0,9
	10,0	70,5	5,1
	100,0	73,0	6,6

4.4. Limite de quantificação

As menores concentrações plasmáticas de (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR, quantificadas, no presente estudo, com coeficientes de variação e inexatidão inferiores a 20 %, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Limites de quantificação para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma.

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão (%)	Inexatidão (%) Erro sistemático
(-)-(S)-VER (n = 3)	1,0	6,8	13,9
(+)-(R)-VER (n = 3)	1,0	7,5	14,1
(S)-NOR (n = 3)	1,0	8,6	14,7
(R)-NOR (n = 3)	1,0	8,9	14,9

4.5. Linearidade

As equações de regressão linear e os respectivos coeficientes de determinação (R^2) obtidos no teste de linearidade para os enantiômeros (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Linearidade para os enantiômeros do VER e NOR em plasma

Fármaco	Concentração (ng mL ⁻¹)	Equação de regressão linear (R ²)
(-)-(S)-VER	1,0 – 250	y = -0,2005 + 0,0275x (0,9923)
(+)-(R)-VER	1,0 – 250	y = -0,2221 + 0,0274x (0,9922)
(S)-NOR	1,0 – 250	y = -0,0545 + 0,0202 (0,9995)
(R)-NOR	1,0 – 250	y = -0,0691 + 0,0200 (0,9986)

R² = coeficiente de determinação

4.6. Precisão e exatidão intra e inter ensaios

Os resultados obtidos no estudo da precisão intra-ensaio e da precisão inter ensaios, do método analítico em estudo, são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Precisão intra-ensaio para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma

Fármaco	X (ng mL ⁻¹)	n	CV (%)
(-)-(S)-VER	1,0	10	6,0
	10,0	10	6,4
	100,0	10	7,0
(+)-(R)-VER	1,0	10	6,4
	10,0	10	5,9
	100,0	10	7,1
(S)-NOR	1,0	10	6,1
	10,0	10	6,3
	100,0	10	5,9
(R)-NOR	1,0	10	10,0
	10,0	10	6,8
	100,0	10	8,0

X = Concentração plasmática teórica; n = número de amostras analisadas; CV = coeficiente de variação

Tabela 5 - Precisão inter ensaios para (-)-(S)-VER, (+)-(R)-VER, (S)-NOR e (R)-NOR em plasma

Fármaco	X (ng mL ⁻¹)	n	$\bar{Y}$ (ng mL ⁻¹)	CV (%)
(-)-(S)-VER	1,0	5	5,0	7,6
	10,0	5	25,1	8,1
	100,0	5	141,3	7,4
(+)-(R)-VER	1,0	5	5,3	9,4
	10,0	5	24,6	9,4
	100,0	5	142,7	7,7
(S)-NOR	1,0	5	4,6	8,2
	10,0	5	25,3	6,9
	100,0	5	136,8	7,2
(R)-NOR	1,0	5	4,5	9,4
	10,0	5	25,4	8,0
	100,0	5	130,3	7,8

X = concentração plasmática teórica; n = número de amostras analisadas CV = coeficiente de variação

Os resultados obtidos no estudo da exatidão intra e inter ensaios do método analítico desenvolvido para a análise dos enantiômeros do VER e NOR em plasma são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Exatidão intra - ensaio para a análise estereosseletiva do VER e NOR em plasma

Fármaco	X (ng mL ⁻¹)	n	$\bar{Y}$ (ng mL ⁻¹)	Erro Sistemático (%)
(-)-(S)-VER	1,0	10	1,1	9,6
	10,0	10	10,9	8,8
	100,0	10	96,3	-3,7
(+)-(R)-VER	1,0	10	1,1	8,9
	10,0	10	10,8	0,8
	100,0	10	97,6	-2,4
(S)-NOR	1,0	10	0,9	-9,3
	10,0	10	10,2	1,9
	100,0	10	98,1	1,8
(R)-NOR	1,0	10	0,9	-9,7
	10,0	10	10,5	4,9
	100,0	10	99,3	0,6

X = concentração real; n = número de amostras analisadas; $\bar{Y}$ = média das concentrações obtidas.

Tabela 7 - Exatidão inter ensaios para análise estereosseletiva do VER e NOR em plasma

Fármaco	X (ng mL ⁻¹)	N	$\bar{Y}$ (ng mL ⁻¹)	Erro Sistemático (%)
(-)-(S)-VER	1,0	5	1,1	7,7
	10,0	5	9,1	-9,0
	100,0	5	103,4	3,4
(+)-(R)-VER	1,0	5	1,0	0,0
	10,0	5	9,2	-7,8
	100,0	5	105,2	5,2
(S)-NOR	1,0	5	0,9	-9,7
	10,0	5	10,4	3,9
	100,0	5	92,8	-7,2
(R)-NOR	1,0	5	1,0	2,1
	10,0	5	9,9	-1,0
	100,0	5	98,3	-1,7

X = concentração real; n = número de amostras analisadas; $\bar{Y}$ = média das concentrações obtidas.

4.7. Estabilidade

Os dados obtidos no estudo da estabilidade dos enantiômeros do VER e NOR em plasma, armazenados a -70°C , até 90 dias estão apresentados na figura 15.

Figura 15. Estabilidade dos enantiômeros do VER e NOR em plasma em função do tempo de armazenamento a -70°C .

4.8. Validação da Câmara de exposição

4.8.1. Homogeneidade

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos no teste de homogeneidade da concentração na câmara de exposição.

Tabela 8 - Homogeneidade do n-hexano na câmara de exposição a solventes.

Concentração de n-hexano (mg/m^3)	Coefficiente de variação (%) (n=12)
50,4	3,0
116,0	2,3

4.8.2. Estabilidade

Os dados obtidos no teste de estabilidade da concentração do n-hexano na câmara de exposição estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Estabilidade da concentração de n-hexano na câmara de exposição.

4.9. Análise farmacocinética

Os dados individuais da análise farmacocinética dos animais dos grupos controle, n-hexano e tolueno estão apresentados no Anexo 2.

4.9.1. Grupo controle

A Figura 17 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR.

Figura 17: Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo controle (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 9 e 10 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo controle tratados com VER racêmico.

Tabela 9 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	69,9 61,0 (46,8-87,1)	40,1* 41,7 (28,7-54,7)
$t_{\max}$ (h)	1,5 1,4 (1,0-1,8)	1,4 1,5 (1,2-1,8)
$t_{1/2}$ (h)	1,1 1,1 (0,9-1,2)	0,9* 0,9 (0,8-1,0)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,9 (0,3-1,5)	0,9 0,9 (0,8-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	250,8 248,1 (174,5-322,3)	120,4* 128,2 (84,8-171,7)
$t_{1/2a}$ (h)	0,9 0,8 (0,4-1,3)	0,9 1,0 (0,7-1,3)
k_a (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,8 0,7 (0,6-0,9)
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	19,7 21,8 (13,5-30,2)	41,9* 42,2 (29,4-55,0)
Vd/F (L kg ⁻¹)	34,4 35,1 (26,3-43,9)	48,0 50,7 (37,0-64,4)
$AUC_{S/R}$		1,9 2,0 (1,3-1,9)

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

Tabela 10 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo controle. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	27,9 28,1 (19,7-36,5)	15,9* 16,3 (13,4-19,3)
$t_{\max}$ (h)	1,7 1,8 (1,28-2,29)	1,3 1,3 (1,0-1,6)
$t_{1/2}$ (h)	0,8 0,78 (0,64-0,92)	0,8 0,9 (0,6-1,1)
k_{el} (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,9 0,9 (0,8-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	72,3 (60,8-95,9)	52,3* 53,1 (40,7-65,6)
$t_{1/2f}$ (h)	0,7 0,7 (0,4-0,9)	0,8 0,8 (0,6-1,1)
k_f (h ⁻¹)	0,9 0,9 (0,8-1,1)	0,9 0,9 (0,7-1,0)
$AUC_{S/R}$		1,5 1,5 (1,0-1,9)

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

4.9.2. Grupo n-hexano

A Figura 18 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 88 mg/m³.

Figura 18. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 88 mg/m³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 11 e 12 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 88 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 11 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
	29,1	24,1
C _{max} (ng mL ⁻¹)	47,9 (25,7-111,6)	29,9 (13,1-52,4)
	1,9	1,4
t _{max} (h)	2,0 (1,0-3,5)	1,5 (1,2-1,9)
	1,5	0,9
t _{1/2} (h)	1,6 (1,1-2,4)	1,0 (0,8-1,3)
	0,5	0,7
k _{el} (h ⁻¹)	0,5 (0,3-0,6)	0,7 (0,6-0,9)
	206,4	93,9*
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	122,2 (122,0-323,1)	100,7 (51,1-168,7)
	1,3	0,9
t _{1/2a} (h)	1,3 (0,1-2,4)	0,8 (0,1-1,2)
	0,6	0,8
k _a (h ⁻¹)	1,2 (0,3-4,9)	2,2 (0,6-8,0)
	25,1	70,3
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	25,5 (15,5-41,0)	61,8 (26,1-97,8)
	63,4	48,9
Vd/F (L kg ⁻¹)	55,2 (28,1-71,6)	44,3 (14,2-79,5)
		2,4
AUC _{S/R}		2,6 (1,2-5,6)

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

Tabela 12 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	23,5 25,1 (7,6-58,0)	19,6 19,5 (7,4-31,7)
$t_{\max}$ (h)	2,1 2,2 (1,6-3,1)	1,3 2,2 (1,1-3,8)
$t_{1/2}$ (h)	1,3 1,3 (0,8-2,1)	0,9 1,2 (0,6-2,5)
k_{el} (h ⁻¹)	0,5 0,6 (0,3-0,8)	0,8 0,7 (0,3-0,9)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	117,3 123,2 (24,3-206,7)	49,1 60,9 (37,6-96,3)
$t_{1/2f}$ (h)	1,3 1,3 (0,8-2,1)	0,9 1,3 (0,7-2,7)
k_f (h ⁻¹)	0,5 0,6 (0,3-0,9)	0,6 0,6 (0,3-0,8)
$AUC_{S/R}$		1,6 2,5 (0,5-5,3)

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

A Figura 19 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 176 mg/m³.

Figura 19. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 176 mg/m³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 13 e 14 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 176 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 13 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
	56,7	33,5
C _{max} (ng mL ⁻¹)	69,2 (32,5-132,3)	30,2 (20,1-41,6)
	1,6	2,0
t _{max} (h)	1,7 (1,3-2,1)	1,8 (1,3-2,4)
	1,1	1,0
t _{1/2} (h)	1,1 (0,8-1,4)	1,1 (0,8-1,5)
	0,7	0,7
k _{el} (h ⁻¹)	0,7 (0,5-0,8)	0,7 (0,5-0,9)
	234,4	101,6
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	260,2 (128,4-430,4)	107,1 (79,7-141,3)
	1,0	0,8
t _{1/2a} (h)	0,9 (0,4-1,4)	1,1 (0,5-2,6)
	0,7	0,8
k _a (h ⁻¹)	0,9 (0,5-1,8)	1,1 (0,5-2,6)
	21,7	49,2
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	22,5 (11,6-38,9)	48,4 (35,4-62,8)
	38,7	87,2
Vd/F (L kg ⁻¹)	35,6 (13,9-56,7)	73,3 (44,2-92,6)
		1,9
AUC _{S/R}		2,5 (1,6-4,2)

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

Tabela 14 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	29,3 34,5 (19,1-64,7)	25,8 25,7 (11,9-38,8)
$t_{\max}$ (h)	2,0 2,0 (2,4-1,4)	2,2 2,3 (3,4-1,5)
$t_{1/2}$ (h)	1,0 0,9 (0,3-1,2)	0,6 0,7 (0,2-1,5)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,7 (0,4-0,8)	0,9 0,9 (0,4-1,3)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	122,3 133,4 (79,4-234,6)	66,3 71,9 (34,8-106,9)
$t_{1/2f}$ (h)	1,1 1,2 (0,9-1,7)	0,8 0,9 (0,5-1,7)
k_f (h ⁻¹)	0,7 0,9 (0,6-2,1)	1,3 1,4 (0,5-3,1)
$AUC_{S/R}$		2,0 2,0 (1,1-3,3)

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

A Figura 20 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 352 mg/m³.

Figura 20. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo n-hexano 352 mg/m³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 15 e 16 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo n-hexano 352 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 15 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	87,2 91,3 (61,3-126,6)	30,4 34,8 (17,1-72,3)
$t_{\max}$ (h)	1,3 1,5 (1,0-2,4)	1,7 1,6 (1,2-2,1)
$t_{1/2}$ (h)	0,9 0,8 (0,7-0,9)	0,9 1,0 (0,7-1,4)
k_{el} (h ⁻¹)	0,9 0,9 (0,7-1,0)	0,8 0,8 (0,5-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	271,6 281,8 (160,2-425,0)	116,2 118,2 (33,1-193,2)
$t_{1/2a}$ (h)	0,8 0,8 (0,5-1,0)	0,9 1,2 (0,5-3,2)
k_a (h ⁻¹)	0,9 0,9 (0,7-1,5)	0,9 1,2 (0,5-3,2)
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	18,4 19,4 (11,8-31,2)	59,9 56,4 (25,9-151,0)
Vd/F (L kg ⁻¹)	24,2 22,4 (14,7-30,1)	61,2 78,9 (26,9-183,3)
$AUC_{S/R}$	2,5 3,4 (0,8-9,9)	

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

Tabela 16 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	25,2 26,2 (8,2-51,4)	18,9 20,0 (10,5-33,1)
$t_{\max}$ (h)	1,5 1,8 (0,8-3,3)	2,0 1,9 (1,1-2,3)
$t_{1/2}$ (h)	0,9 1,0 (0,6-1,6)	1,0 1,0 (0,6-1,3)
k_{el} (h ⁻¹)	0,8 0,8 (0,2-1,2)	0,8 0,9 (0,5-1,7)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	116,4 130,1 (79,1-237,1)	59,7 64,63 (52,7-90,7)
$t_{1/2f}$ (h)	0,8 1,22 (0,6-2,9)	0,9 0,9 (0,4-1,3)
k_f (h ⁻¹)	0,7 0,8 (0,4-1,2)	0,7 0,8 (0,5-1,1)
$AUC_{S/R}$	2,2 2,2 (0,9-4,1)	

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

4.9.3. Grupo tolueno

A Figura 21 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 94 mg/m^3 .

Figura 21. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 94 mg/m^3 ($n=6/\text{tempo de colheita}$). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 94 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 17 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
	68,8	37,9
C _{max} (ng mL ⁻¹)	94,7 (33,2-201,8)	55,8 (18,3-99,8)
	1,8	1,4
t _{max} (h)	1,7 (1,3-1,8)	1,8 (1,3-3,0)
	1,1	0,9
t _{1/2} (h)	1,3 (1,0-1,8)	1,1 (0,7-2,1)
	0,6	0,8
k _{el} (h ⁻¹)	0,6 (0,4-0,7)	0,7 (0,3-0,9)
	295,4	257,8
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	346,8 (146,9-636,6)	241,6 (49,6-473,0)
	1,0	0,8
t _{1/2a} (h)	0,8 (0,1-1,0)	1,0 (0,5-2,0)
	0,7	0,9
k _a (h ⁻¹)	0,8 (0,6-1,3)	0,8 (0,3-1,4)
	18,6	18,0
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	19,1 (7,9-34,0)	38,5 (10,6-100,8)
	28,6	49,0
Vd/F (L kg ⁻¹)	32,3 (20,1-56,3)	54,4 (18,4-132,0)
		1,1
AUC _{S/R}		1,8 (0,7-3,6)

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

Tabela 18 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	25,3 25,1 (18,8-31,7)	9,4 12,6 (8,9-23,8)
$t_{\max}$ (h)	2,1 2,0 (1,6-2,4)	1,8 1,9 (1,2-2,5)
$t_{1/2}$ (h)	0,8 0,8 (0,3-1,4)	0,9 0,8 (0,2-1,1)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,7 (0,4-0,9)	0,7 0,8 (0,6-1,1)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	73,4 91,9 (62,8-176,5)	40,3 43,7 (21,0-89,5)
$t_{1/2f}$ (h)	1,0 1,14 (0,8-1,6)	1,0 1,0 (0,7-1,1)
k_f (h ⁻¹)	0,9 1,5 (0,5-2,7)	0,7 1,3 (0,6-3,4)
$AUC_{S/R}$	2,0 2,3 (1,5-3,5)	

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

A Figura 22 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 188 mg/m³.

Figura 22. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 188 mg/m³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 19 e 20 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 188 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 19 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
	92,2	30,3
C _{max} (ng mL ⁻¹)	110,3 (24,3-250,6)	38,2 (18,0-81,2)
	1,5	2,0
t _{max} (h)	1,9 (1,4-3,0)	2,2 (1,8-3,3)
	0,9	1,2
t _{1/2} (h)	1,1 (0,7-2,0)	1,1 (0,6-1,3)
	0,8	0,6
k _{el} (h ⁻¹)	0,7 (0,3-1,0)	0,7 (0,5-1,3)
	292,4	138,1
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	378,6 (196,4-900,9)	156,4 (345,2-38,8)
	0,8	1,2
t _{1/2a} (h)	1,0 (2,0-0,7)	1,0 (0,5-1,3)
	0,8	0,6
k _a (h ⁻¹)	0,8 (0,3-1,0)	0,8 (0,5-1,3)
	17,1	36,2
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	17,9 (5,5-25,5)	48,7 (14,5-129,0)
	23,6	61,3
Vd/F (L kg ⁻¹)	42,0 (17,4-76,2)	63,3 (22,6-102,9)
		1,4
AUC _{S/R}		5,9 (0,9-23,2)

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

Tabela 20 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	20,7 27,0 (10,1-68,7)	18,2 22,54 (12,9-44,9)
$t_{\max}$ (h)	1,5 1,6 (1,1-2,5)	2,3 2,4 (1,4-3,6)
$t_{1/2}$ (h)	0,9 1,1(0,6-1,7)	0,8 0,9 (0,4-1,9)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,8 (0,4-1,2)	0,8 0,9 (0,4-1,6)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	83,8 80,7 (27,7-158,5)	90,9 78,8 (27,4-107,6)
$t_{1/2f}$ (h)	0,7 0,8 (0,1-1,8)	0,8 0,9 (0,4-1,9)
k_f (h ⁻¹)	1,0 0,9 (0,4-1,2)	0,8 0,9 (0,4-1,6)
$AUC_{S/R}$	0,9 1,7 (0,3-5,8)	

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

A Figura 23 apresenta as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 376 mg/m³.

Figura 23. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER e do NOR do grupo tolueno 376 mg/m³ (n=6/tempo de colheita). Dados apresentados como medianas.

As Tabelas 21 e 22 apresentam os parâmetros farmacocinéticos calculados para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais do grupo tolueno 376 mg/m³ tratados com VER racêmico.

Tabela 21 - Disposição cinética estereosseletiva do verapamil para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(-)-(S)-VER	(+)-(R)-VER
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	51,4 54,2 (38,0-82,8)	23,7 23,3 (16,0-28,3)
$t_{\max}$ (h)	2,2 2,1 (1,6-2,3)	2,0 2,1 (1,0-2,9)
$t_{1/2}$ (h)	1,7 1,6 (1,4-1,9)	1,4 1,4 (0,7-1,9)
k_{el} (h ⁻¹)	0,4 0,4 (0,4-0,5)	0,5 0,6 (0,4-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	308,8 297,9 (220,1-379,2)	129,7 121,8 (64,6-149,2)
$t_{1/2a}$ (h)	1,5 1,3 (0,7-1,6)	1,4 1,4 (0,7-2,0)
k_a (h ⁻¹)	0,5 0,6 (0,4-1,0)	0,5 0,6 (0,1-0,4)
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	16,2 17,5 (13,2-22,7)	38,50 45,1 (33,5-77,4)
Vd/F (L kg ⁻¹)	40,5 40,4 (32,4-48,3)	77,3 77,3 (65,3-113,3)
$AUC_{S/R}$		2,0 2,6 (1,7-5,0)

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

Tabela 22 - Disposição cinética estereosseletiva do norverapamil para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados apresentados como mediana, média e IC 95%.

Parâmetro	(S)-NOR	(R)-NOR
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	44,1 38,5 (14,8-56,4)	19,6 19,2 (15,2-21,1)
$t_{\max}$ (h)	1,9 2,1 (1,5-3,30)	1,8 2,1 (1,4-3,3)
$t_{1/2}$ (h)	0,7 0,9 (0,1-2,3)	1,2 1,4 (0,7-2,3)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,6 (0,3-0,9)	0,6 0,6 (0,3-0,9)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	167,3 144,3 (51,9-194,2)	62,8 78,3 (36,7-136,8)
$t_{1/2f}$ (h)	1,0 1,0 (0,7-1,4)	1,2 1,4 (0,7-2,3)
k_f (h ⁻¹)	0,8 0,8 (0,5-1,0)	0,8 1,0 (0,3-2,5)
$AUC_{S/R}$	2,0 2,3 (0,9-5,2)	

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

4.9.4. Avaliação da influência da exposição ao n-hexano na farmacocinética estereosseletiva do verapamil e do norverapamil em ratos tratados com VER racêmico.

As Figuras 24 e 25 apresentam, respectivamente, as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais dos grupos controle, n-hexano 88 mg/m³, n-hexano 176 mg/m³ e n-hexano 352 mg/m³.

Figura 24. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do VER nos grupos controle, n-hexano 88 mg/m³, n-hexano 176 mg/m³ e n-hexano 352 mg/m³. Dados apresentados como medianas.

Figura 25. Curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo dos enantiômeros do NOR nos grupos controle, n-hexano 88 mg/m³, n-hexano 176 mg/m³ e n-hexano 352 mg/m³. Dados apresentados como medianas.

As tabelas 23 e 24 apresentam, respectivamente, a disposição cinética dos enantiômeros do VER e do NOR nos grupos controle, n-hexano 88 mg/m³, n-hexano 176 mg/m³ e n-hexano 352 mg/m³. Os parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero do VER relativos aos grupos n-hexano 88 mg/m³, 176 mg/m³ e 352 mg/m³ foram comparados com aqueles do grupo controle empregando o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn ($P < 0,05$).

Tabela 23 - Avaliação da influência do n-hexano na farmacocinética dos enantiômeros do VER.

(-)-(S)-VER					(+)-(R)-VER			
Parâmetro	Controle	n-hexano 88 mg/m ³	n-hexano 176 mg/m ³	n-hexano 352 mg/m ³	Controle	n-hexano 88 mg/m ³	n-hexano 176 mg/m ³	n-hexano 352 mg/m ³
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	69,9 61,0 (46,8-87,1)	29,1 47,9 (25,7-111,6)	56,7 69,2 (32,5-132,3)	87,2 91,3 (61,3-126,6)	40,1 41,7 (28,7-54,7)	24,1 29,9 (13,1-52,4)	33,5 30,2 (20,1-41,6)	30,4 34,8 (17,1-72,3)
$t_{\max}$ (h)	1,5 1,4 (1,0-1,8)	1,9 2,0 (1,0-3,5)	1,6 1,7 (1,3-2,1)	1,3 1,5 (1,0-2,4)	1,4 1,5 (1,2-1,8)	1,4 1,5 (1,2-1,9)	2,0 1,8 (1,3-2,4)	1,7 1,6 (1,2-2,1)
$t_{1/2}$ (h)	1,1 1,1 (0,9-1,2)	1,5 1,6 (1,1-2,4)	1,1 1,1 (0,8-1,4)	0,9* 0,8 (0,7-0,9)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,9 1,0 (0,8-1,3)	1,0 1,1 (0,8-1,5)	0,9 1,0 (0,7-1,4)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,9 (0,3-1,5)	0,5* 0,5 (0,3-0,6)	0,7 0,7 (0,5-0,8)	0,9* 0,9 (0,7-1,0)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,7 0,7 (0,6-0,9)	0,7 0,7 (0,5-0,9)	0,8 0,8 (0,5-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	250,8 248,1 (174,5-322,3)	206,4 122,2 (122,0-323,1)	234,4 260,2 (128,4-430,4)	271,6 281,8 (160,2-425,0)	120,4 128,2 (84,8-171,7)	93,9 100,7 (51,1-168,7)	101,6 107,1 (79,7-141,3)	116,2 118,2 (33,1-193,2)
$t_{1/2a}$ (h)	0,9 0,8 (0,4-1,3)	1,3 1,3 (0,1-2,4)	1,0 0,9 (0,4-1,4)	0,8* 0,8 (0,5-1,0)	0,9 1,0 (0,7-1,3)	0,9 0,8 (0,1-1,2)	0,8 1,1 (0,5-2,6)	0,9 1,2 (0,5-3,2)
k_a (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,6 1,2 (0,3-4,9)	0,7 0,9 (0,5-1,8)	0,9 0,9 (0,7-1,5)	0,8 0,7 (0,6-0,9)	0,8 2,2 (0,6-8,0)	0,8 1,1 (0,5-2,6)	0,9 1,2 (0,5-3,2)
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	19,7 21,8 (13,5-30,2)	25,1 25,5 (41,0-15,5)	21,7 22,5 (11,6-38,9)	18,4 19,4 (31,2-11,8)	41,9 42,2 (29,4-55,0)	70,3 61,8 (97,8-26,1)	49,2 48,4 (35,4-62,8)	59,9 56,4 (25,9-151,0)
Vd/F (L kg ⁻¹)	34,4 35,1 (26,3-43,9)	63,4 55,2 (28,1-71,6)	38,7 35,6 (13,9-56,7)	24,2* 22,4 (14,7-30,1)	48,0 50,7 (37,0-64,4)	48,9 44,3 (14,2-79,5)	87,2 73,3 (44,2-92,6)	61,2 78,9 (26,9-183,3)
$AUC_{S/R}$	Controle		n-hexano 88 mg/m ³		n-hexano 176 mg/m ³		n-hexano 352 mg/m ³	
	1,9 2,0 (1,3-1,9)		1,6 2,5 (0,5-5,3)		1,9 2,5 (1,6-4,2)		2,5 3,4 (0,8-9,9)	

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

*n-hexano 88 ppm versus n-hexano 352 ppm.

Tabela 24 - Avaliação da influência do n-hexano na farmacocinética dos enantiômeros do NOR.

	(S)-NOR				(R)-NOR			
Parâmetro	Controle	n-hexano 88 mg/m ³	n-hexano 176 mg/m ³	n-hexano 352 mg/m ³	Controle	n-hexano 94 mg/m ³	n-hexano 188 mg/m ³	n-hexano 376 mg/m ³
C _{max} (ng mL ⁻¹)	27,9 28,1 (19,7-36,5)	23,5 25,1 (7,6-58,0)	29,3 34,5 (19,1-64,7)	25,2 26,2 (8,2-51,4)	15,9* 16,3 (13,4-19,3)	19,6 19,5 (7,4-31,7)	25,8 25,7 (11,9-38,8)	18,9 20,0 (10,5-33,1)
t _{max} (h)	1,7 1,8 (1,28-2,29)	2,1 2,2 (1,6-3,1)	2,0 2,0 (2,4-1,4)	1,5 1,8 (0,8-3,3)	1,3 1,3 (1,0-1,6)	1,3 2,2 (1,1-3,8)	2,2 2,3 (3,4-1,5)	2,0 1,9 (1,1-2,3)
t _{1/2} (h)	0,8 0,78 (0,64-0,92)	1,3 1,3 (0,8-2,1)	1,0 0,9 (0,3-1,2)	0,9 1,0 (0,6-1,6)	0,8 0,9 (0,6-1,1)	0,9 1,2 (0,6-2,5)	0,6 0,7 (0,2-1,5)	1,0 1,0 (0,6-1,3)
k _{el} (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,5 0,6 (0,3-0,8)	0,7 0,7 (0,4-0,8)	0,8 0,8 (0,2-1,2)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,8 0,7 (0,3-0,9)	0,9 0,9 (0,4-1,3)	0,8 0,9 (0,5-1,7)
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	72,3 (60,8-95,9)	117,3 123,2 (24,3-206,7)	122,3 133,4 (79,4-234,6)	116,4 130,1 (79,1-237,1)	52,3* 53,1 (40,7-65,6)	49,1 60,9 (37,6-96,3)	66,3 71,9 (34,8-106,9)	59,7 64,63 (52,7-90,7)
t _{1/2f} (h)	0,7 0,7 (0,4-0,9)	1,3 1,3 (0,8-2,1)	1,1 1,2 (0,9-1,7)	0,8 1,22 (0,6-2,9)	0,8 0,8 (0,6-1,1)	0,9 1,3 (0,7-2,7)	0,8 0,9 (0,5-1,7)	0,9 0,9 (0,4-1,3)
k _f (h ⁻¹)	0,9 0,9 (0,8-1,1)	0,5 0,6 (0,3-0,9)	0,7 0,9 (0,6-2,1)	0,7 0,8 (0,4-1,2)	0,9 0,9 (0,7-1,0)	0,6 0,6 (0,3-0,8)	1,3 1,4 (0,5-3,1)	0,7 0,8 (0,5-1,1)
AUC _{S/R}	Controle	n-hexano 88 mg/m ³		n-hexano 176 mg/m ³		n-hexano 352 mg/m ³		
	1,5 1,5 (1,0-1,9)	1,6 2,5 (0,5-5,3)		2,0 2,0 (1,1-3,3)		2,2 2,2 (0,9-4,1)		

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

4.9.5. Avaliação da influência da exposição ao tolueno na farmacocinética do verapamil e do norverapamil em ratos tratados com VER racêmico.

As Figuras 26 e 27 apresentam, respectivamente, as curvas de concentrações plasmáticas *versus* tempo para os enantiômeros do VER e do NOR nos animais dos grupos controle, tolueno 94 mg/m³, tolueno 188 mg/m³ e tolueno 376 mg/m³.

Figura 26. Curvas de concentrações plasmáticas versus tempo dos enantiômeros do VER dos grupos controle, tolueno 94 mg/m³, tolueno 188 mg/m³ e tolueno 376 mg/m³. Dados apresentados como medianas.

Figura 27. Curvas de concentrações plasmáticas versus tempo dos enantiômeros do NOR dos grupos controle, tolueno 94 mg/m³, tolueno 188 mg/m³ e tolueno 376 mg/m³. Dados apresentados como medianas.

As tabelas 25 e 26 apresentam, respectivamente a disposição cinética dos enantiômeros do VER e do NOR nos grupos controle, tolueno 94 mg/m³, tolueno 188 mg/m³ e tolueno 376 mg/m³. Os parâmetros farmacocinéticos de cada enantiômero do VER relativos aos grupos tolueno 94 mg/m³, 188 mg/m³ e 376 mg/m³ foram comparados com aqueles do grupo controle empregando o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de comparações múltiplas de Dunn ($P \leq 0,05$)

Tabela 25 - Avaliação da influência do tolueno na farmacocinética dos enantiômeros do VER.

	(-)-(S)-VER				(+)-(R)-VER			
Parâmetro	Controle	Tolueno 94 mg/m ³	Tolueno 188 mg/m ³	Tolueno 376 mg/m ³	Controle	Tolueno 94 mg/m ³	Tolueno 188 mg/m ³	Tolueno 376 mg/m ³
$C_{\max}$ (ng mL ⁻¹)	69,9 61,0 (46,8-87,1)	68,8 94,7 (33,2-201,8)	92,2 110,3 (24,3-250,6)	51,4 54,2 (38,0-82,8)	40,1 41,7 (28,7-54,7)	37,9 55,8 (18,3-99,8)	30,3 38,2 (18,0-81,2)	23,7 23,3 (16,0-28,3)
$t_{\max}$ (h)	1,5 1,4 (1,0-1,8)	1,8 1,7 (1,3-1,8)	1,5 1,9 (1,4-3,0)	2,2 2,1 (1,6-2,3)	1,4 1,5 (1,2-1,8)	1,4 1,8 (1,3-3,0)	2,0 2,2 (1,8-3,3)	2,0 2,1 (1,0-2,9)
$t_{1/2}$ (h)	1,1 1,1 (0,9-1,2)	1,1 1,3 (1,0-1,8)	0,9 1,1 (0,7-2,0)	1,7* 1,6 (1,4-1,9)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,9 1,1 (0,7-2,1)	1,2 1,1 (0,6-1,3)	1,4* 1,4 (0,7-1,9)
k_{el} (h ⁻¹)	0,7 0,9 (0,3-1,5)	0,6 0,6 (0,4-0,7)	0,8 0,7 (0,3-1,0)	0,4* 0,4 (0,4-0,5)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,8 0,7 (0,3-0,9)	0,6 0,7 (0,5-1,3)	0,5 0,6 (0,4-1,0)
$AUC^{0-\infty}$ (ng mL ⁻¹ h)	250,8 248,1 (174,5-322,3)	295,4 346,8 (146,9-636,6)	292,4 378,6 (196,4-900,9)	308,8 297,9 (220,1-379,2)	120,4 128,2 (84,8-171,7)	257,8 241,6 (49,6-473,0)	138,1 156,4 (345,2-38,8)	129,7 121,8 (64,6-149,2)
$t_{1/2a}$ (h)	0,9 0,8 (0,4-1,3)	1,0 0,8 (0,1-1,0)	0,8 1,0 (2,0-0,7)	1,5 1,3 (0,7-1,6)	0,9 1,0 (0,7-1,3)	0,8 1,0 (0,5-2,0)	1,2 1,0 (0,5-1,3)	1,4 1,4 (0,7-2,0)
k_a (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,7 0,8 (0,6-1,3)	0,8 0,8 (0,3-1,0)	0,5 0,6 (0,4-1,0)	0,8 0,7 (0,6-0,9)	0,9 0,8 (0,3-1,4)	0,6 0,8 (0,5-1,3)	0,5 0,6 (0,1-0,4)
Cl/F (L h ⁻¹ kg ⁻¹)	19,7 21,8 (13,5-30,2)	18,6 19,1 (7,9-34,0)	17,1 17,9 (5,5-25,5)	16,2 17,5 (13,2-22,7)	41,9 42,2 (29,4-55,0)	18,0 38,5 (10,6-100,8)	36,2 48,7 (14,5-129,0)	38,50 45,1 (33,5-77,4)
Vd/F (L kg ⁻¹)	34,4 35,1 (26,3-43,9)	28,6 32,3 (20,1-56,3)	23,6 42,0 (17,4-76,2)	40,5 40,4 (32,4-48,3)	48,0 50,7 (37,0-64,4)	49,0 54,4 (18,4-132,0)	61,3 63,3 (22,6-102,9)	77,3 77,3 (65,3-113,3)
$AUC_{S/R}$	Controle	Tolueno 94 mg/m ³		Tolueno 188 mg/m ³		Tolueno 376 mg/m ³		
	1,9 2,0 (1,3-1,9)	1,1 1,8 (0,7-3,6)		1,4 5,9 (0,9-23,2)		2,0 2,6 (1,7-5,0)		

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

*tolueno 188 ppm versus tolueno 376 ppm.

Tabela 26 - Avaliação da influência do tolueno na farmacocinética dos enantiômeros do NOR.

	(S)-NOR				(R)-NOR			
Parâmetro	Controle	Tolueno 94 mg/m ³	Tolueno 188 mg/m ³	Tolueno 376 mg/m ³	Controle	Tolueno 94 mg/m ³	Tolueno 188 mg/m ³	Tolueno 376 mg/m ³
C _{max} (ng mL ⁻¹)	27,9 28,1 (19,7-36,5)	25,3 25,1 (18,8-31,7)	20,7 27,0 (10,1-68,7)	44,1 38,5 (14,8-56,4)	15,9 16,3 (13,4-19,3)	9,4 12,6 (8,9-23,8)	18,2 22,54 (12,9-44,9)	19,6 19,2 (15,2-21,1)
t _{max} (h)	1,7 1,8 (1,28-2,29)	2,1 2,0 (1,6-2,4)	1,5 1,6 (1,1-2,5)	1,9 2,1 (1,5-3,30)	1,3 1,3 (1,0-1,6)	1,8 1,9 (,2-2,5)	2,3* 2,4 (1,4-3,6)	1,8 2,1 (1,4-3,3)
t _{1/2} (h)	0,8 0,78 (0,64-0,92)	0,8 0,8 (0,3-1,4)	0,9 1,1(0,6-1,7)	0,7 0,9 (0,1-2,3)	0,8 0,9 (0,6-1,1)	0,9 0,8 (0,2-1,1)	0,8 0,9 (0,4-1,9)	1,2 1,4 (0,7-2,3)
k _{el} (h ⁻¹)	0,8 1,2 (0,2-2,3)	0,7 0,7 (0,4-0,9)	0,7 0,8 (0,4-1,2)	0,7 0,6 (0,3-0,9)	0,9 0,9 (0,8-1,0)	0,7 0,8 (0,6-1,1)	0,8 0,9 (0,4-1,6)	0,6 0,6 (0,3-0,9)
AUC ^{0-∞} (ng mL ⁻¹ h)	72,3 (60,8-95,9)	73,4 91,9 (62,8-176,5)	83,8 80,7 (27,7-158,5)	167,3 144,3 (51,9-194,2)	52,3 53,1 (40,7-65,6)	40,3 43,7 (21,0-89,5)	90,9 78,8 (27,4-107,6)	62,8 78,3 (36,7-136,8)
t _{1/2f} (h)	0,7 0,7 (0,4-0,9)	1,0 1,14 (0,8-1,6)	0,7 0,8 (0,1-1,8)	1,0 1,0 (0,7-1,4)	0,8 0,8 (0,6-1,1)	1,0 1,0 (0,7-1,1)	0,8 0,9 (0,4-1,9)	1,2 1,4 (0,7-2,3)
k _f (h ⁻¹)	0,9 0,9 (0,8-1,1)	0,9 1,5 (0,5-2,7)	1,0 0,9 (0,4-1,2)	0,8 0,8 (0,5-1,0)	0,9 0,9 (0,7-1,0)	0,7 1,3 (0,6-3,4)	0,8 0,9 (0,4-1,6)	0,8 1,0 (0,3-2,5)
AUC _{S/R}	Controle	Tolueno 94 mg/m ³	Tolueno 188 mg/m ³		Tolueno 376 mg/m ³			
	1,5 1,5 (1,0-1,9)	2,0 2,3 (1,5-3,5)	0,9 1,7 (0,3-5,8)		2,0 2,3 (0,9-5,2)			

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

*controle versus tolueno 188 ppm.

5. DISCUSSÃO

Os estudos de estereosseletividade na disposição cinética e no metabolismo de fármacos exigem a disponibilidade de métodos analíticos com limites de confiança compatíveis com as exigências da investigação.

A análise por HPLC dos enantiômeros do VER e do NOR em plasma de humanos ou de animais de experimentação tem sido descrita por poucos autores. Os métodos inicialmente descritos empregam separação aquiral seguida de análise quiral com detecção por fluorescência. Chu e Wainer (1989) reportam a determinação dos enantiômeros do VER e do NOR em plasma usando uma coluna de fase hidrofóbica (Hisep[®]) acoplada a uma coluna α 1-glicoproteína ácida (AGP). A coluna Hisep[®] foi utilizada para separar o VER e o NOR dos componentes do plasma, sendo os eluentes então seletivamente transferidos para a coluna AGP onde os enantiômeros foram separados. Oda et al (1991) desenvolveram outro método empregando HPLC aquiral-quiral acoplando uma coluna ODS a uma coluna quiral ovomucóide (Ultron[®] ES-OVM) para a determinação seqüencial dos enantiômeros do VER. Shibukawa e Wainer (1992) descrevem um método para análise enantiosseletiva do VER e do NOR usando uma coluna de sílica diol (LiChrocart[®] DIOL) e uma coluna Chiralpak AD[®] conectadas em série. Brandsteterová e Wainer (1999) reportam uma análise aquiral e quiral para o VER e seus sete metabólitos em soro usando uma coluna aquiral de fase reversa NovaPak[®] C18 acoplada a uma coluna quiral AGP.

Stagni e Gillespie (1995) reportam um método empregando HPLC com detecção por fluorescência para a determinação direta dos enantiômeros do VER e do NOR em plasma usando coluna quiral AGP. O NOR foi imediatamente acetilado a N-acetilnorverapamil no solvente de extração (2% de butanol em hexano). O N-acetilnorverapamil e o VER foram então separados na coluna AGP.

Hedeland et al (2004) desenvolveram um método enantiosseletivo empregando LC-MS/MS para a determinação simultânea do VER e do NOR em plasma humano sem a necessidade da separação aquiral ou da derivação química. Os enantiômeros não foram bem separados na coluna AGP com a eluição do segundo enantiômero do VER interferindo com o primeiro enantiômero do NOR. No entanto, o VER pode ser detectado separadamente do NOR devido as suas diferentes massas moleculares.

No presente estudo foi desenvolvido um método para a análise estereosseletiva simultânea do VER e do seu metabólito NOR em somente 100 μ L

de plasma de ratos empregando LC-MS/MS e coluna de fase quiral Chiralpak AD[®] com aplicação em estudos de disposição cinética e metabolismo.

Os enantiômeros do VER e NOR foram eluídos da coluna Chiralpak AD[®] em somente 12 min, correspondendo a quase metade do tempo do cromatograma reportado por Hedeland et al (2004), os quais descrevem eluição dos enantiômeros em 20 min com co-eluição dos enantiômeros do VER e do NOR.

A ordem de eluição dos enantiômeros do VER foi estabelecida através da análise do enantiômero puro (+)-(R)-VER utilizando-se das mesmas condições no sistema cromatográfico. Já a ordem de eluição dos enantiômeros do NOR foi estabelecida analisando-se uma solução racêmica de NOR de acordo com a metodologia descrita no estudo de Shibukawa e Wainer (1992), os quais também empregam a coluna de fase quiral Chiralpak AD[®] na separação seqüencial dos enantiômeros do VER e NOR.

A análise das amostras de plasma branco coletado de diferentes ratos não mostra interferência de componentes endógenos. Os cromatogramas referentes ao plasma branco, plasma enriquecido com VER e NOR e plasma obtido de ratos tratados com VER racêmico estão apresentados na Figura 10.

Os enantiômeros do VER e o NOR foram extraídos do plasma em pH = 10 usando hexano como solvente extrator. As recuperações obtidas para ambos os enantiômeros do VER e NOR são maiores que 70% e independentes da concentração no intervalo de 1,0 a 100 ng/mL (Tabela 1). Recuperações próximas a 80% ou 100% para ambos os enantiômeros do VER e do NOR tem sido descritas quando amostras de plasma são extraídas com heptano ou hexano contendo 2% de sec-butanol (STAGNI E GILLESPIE, 1995; SHIBUKAWA e WAINER, 1992). Borges et al (2005) relatam recuperação de 95% na análise aquiral do VER em plasma usando éter dietílico como solvente extrator.

Os limites de quantificação de 1,0 ng para cada enantiômero do VER por mL de plasma e 1,0 ng para cada enantiômero do NOR por mL de plasma, apresentados na Tabela 2, são resultantes da extração de apenas 100 µL de plasma e permitem a aplicação do método no estudo de disposição cinética e metabolismo do VER administrado a ratos em regime de dose única. Hedeland et al (2004) relatam limite de quantificação de 100 pg/mL e 120 pg/mL de plasma, respectivamente, para os enantiômeros do VER e NOR empregando volume de 500 µL de plasma. Os limites de quantificação reportados por von Richter et al (2000) foram de 0,5 ng/mL na

análise aquiral do VER e do NOR em alíquotas de 1,0 mL de plasma e emprego de LC-MS. Borges et al (2005) reportam a análise aquiral do VER e descrevem limite de quantificação de 1,0 ng/mL na análise de 200 μ L de plasma usando LC-MS/MS. Os métodos que empregaram detecção por fluorescência são comparativamente menos sensíveis do que aqueles que empregam MS ou MS/MS. Os limites de quantificação relatados nos estudos com detecção por fluorescência variam entre 2,5-3,0 ng/mL para os enantiômeros do VER e de 2,0-5,0 ng/mL para os enantiômeros do NOR.

Nos estudos de precisão intra e inter ensaios, os coeficientes de variação obtidos são iguais ou inferiores a 10% (Tabelas 4 e 5) o que indica a alta precisão do método analítico.

Os resultados obtidos nos testes de exatidão apresentados nas Tabelas 6 e 7 estão dentro do intervalo de erro aceitável de 15%, demonstrando que o método além de preciso é bastante exato.

O teste de estabilidade de longa duração assegura que as amostras de plasma podem ser armazenadas por um período de 90 dias, desde a coleta até a análise, com uma variação inferior a 10% (Figura 15).

O método desenvolvido e validado no presente estudo permite a resolução direta dos enantiômeros do VER e do NOR em coluna de fase quiral, emprega apenas 100 μ L de plasma e apresenta alta sensibilidade podendo ser aplicado no estudo da disposição cinética e do metabolismo estereosseletivos do VER administrado em regime de dose única (10 mg/kg) a ratos.

Os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao n-hexano estão bem descritos na literatura. No entanto, não há dados relativos aos possíveis efeitos da exposição ao solvente na atividade do CYP e, conseqüentemente, no metabolismo de medicamentos que depende desse sistema enzimático. O presente estudo avalia pela primeira vez a influência da exposição ao n-hexano na disposição cinética e no metabolismo dos enantiômeros do verapamil em ratos.

Os animais do grupo controle foram contidos na câmara de exposição, expostos apenas ao ar, durante 6 h/dia, por um período de 5 dias, tendo sido tratados no quinto dia com dose única oral de cloridrato de verapamil racêmico (10 mg/kg). A disposição cinética do verapamil é enantiosseletiva nos ratos Wistar do grupo controle com acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-VER (250,8 vs 120,4 ng. mL⁻¹.h) e *clearance* do (+)-(R)-VER (41,9 L h⁻¹kg⁻¹) maior que o do (-)-(S)-VER

(19,7 L h⁻¹kg⁻¹); $P \leq 0,05$ (Tabela 9). Os dados obtidos estão de acordo com o estudo de Bhatti & Foster (1997) que reportam que na administração oral o *clearance* do (+)-(R)-VER (53,34 L h⁻¹kg⁻¹) é maior que o do (-)-(S)-VER (21,10 L h⁻¹kg⁻¹) em ratos Sprague-Dawley. As razões de AUC_{S/R} de 1,9 (Tabela 10) observadas para os animais do grupo controle estão de acordo com os dados de Hanada et al (1998) que relatam que as concentrações do (-)-(S)-VER em plasma de ratos são, aproximadamente, o dobro daquelas observadas para o (+)-(R)-VER. Os dados apresentados na Tabela 9 para os animais do grupo controle ainda mostraram maiores valores de C_{max} (69,9 vs 40,1 ng mL⁻¹) e meia-vida de eliminação mais prolongada (1,1 vs 0,9 h) para o eutômero (-)-(S)-VER; $P \leq 0,05$.

A disposição cinética do metabólito NOR também é enantiosseletiva nos animais do grupo controle com observações de maiores valores de C_{max} (27,9 vs 15,9 ng mL⁻¹) e AUC^{0 - ∞} (72,3 vs 52,3 ng mL⁻¹ h⁻¹) para o (S)-NOR; $P \leq 0,05$ (Tabela 10). Os dados apresentados na Tabela 10 mostram razões de AUC_{S/R} de 1,5 para os animais desse grupo. Robinson e Mehvar (1996) relatam que a fração livre do (S)-NOR é menor do que a do (R)-NOR com razão de fração livre S/R de, aproximadamente, 0,8 em plasma de ratos e que a enantiosseletividade é menor para o NOR comparado com o VER (razão de fração livre S/R de, aproximadamente, 0,6).

Os animais foram expostos a três diferentes concentrações de n-hexano, escolhidas em função do limite de exposição proposto para o ser humano no ambiente de trabalho. Um dos grupos foi exposto em concentração equivalente ao TLV-TWA de 176 mg/m³, outro grupo foi exposto à concentração equivalente à metade do TLV-TWA (88 mg/m³) e o outro foi exposto ao n-hexano na concentração equivalente ao dobro do TLV-TWA (352 mg/m³).

Os animais foram expostos aos vapores de n-hexano em câmara do tipo *nose only exposure system* (Figuras 2-8). As vantagens desta forma de exposição são a utilização de menor quantidade de n-hexano a ser inalado, a obtenção de exposição mais uniforme entre os animais, a maior facilidade de controle e a prevenção da exposição ao solvente por outras vias. A câmara de exposição utilizada no presente estudo foi dotada de onze portas, sendo possível expor até dez animais simultaneamente e considerando a reserva de uma porta para amostragens da atmosfera experimental e verificação da concentração e sua estabilidade. O

desempenho da câmara de exposição foi avaliado com base em testes de homogeneidade e estabilidade. No ensaio de homogeneidade foram coletadas amostras de uma atmosfera de 116 mg/m³ de n-hexano, em 04 portas não consecutivas, obtendo-se coeficientes de variação de 2,30% (Tabela 8). No ensaio de estabilidade foram coletadas 06 amostras de 01 h de duração, em duas portas não contíguas, na concentração de 267 mg/m³ de n-hexano, observando-se coeficientes de variação de 2,54% e 2,48% para cada porta amostrada (Figura 16). Assim, pode-se considerar que o desempenho do equipamento é satisfatório para a exposição ao n-hexano.

Os animais foram expostos ao n-hexano durante 6 h/dia, por 05 dias consecutivos, tendo sido tratados no quinto dia com dose única oral de cloridrato de verapamil racêmico.

A disposição cinética do VER para os animais do grupo n-hexano expostos a 88 mg/m³, à semelhança do grupo controle, foi enantiosseletiva com observação de acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-VER ($AUC^{0-\infty}$ 206,4 vs 93,9 ng. h. mL⁻¹); $P \leq 0,05$ (Tabela 11). Em relação ao metabólito NOR não foram observadas diferenças com significância estatística entre os enantiômeros (Tabela 12).

Para as exposições nas concentrações de 176 e 352 mg/m³ de n-hexano não foram observadas diferenças significativas entre os enantiômeros do VER ou entre os enantiômeros do NOR para todos os parâmetros avaliados (Tabelas 13 a 16). Os dados apresentados permitem inferir que a exposição ao n-hexano em concentrações iguais ou maiores que o TLV-TWA resultam em perda da enantiosseletividade na disposição cinética e no metabolismo do VER administrado a ratos.

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do VER não mostram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os animais expostos ao n-hexano nas concentrações 88, 176 e 352 mg/m³ (Tabela 23). Ressalta-se, no entanto, que os intervalos de confiança 95% obtidos, por exemplo, para o parâmetro $AUC^{0-\infty}$ do VER, apresentados na Tabela 23, mostram maior variabilidade nos grupos expostos ao n-hexano principalmente para o enantiômero (-)-(S)-VER.

Concluindo, os dados obtidos no presente estudo permitem inferir que a exposição ao n-hexano, em concentrações menores, iguais ou maiores que o TLV-

TWA, resulta em perda da enantiosseletividade na disposição cinética do VER em ratos. No entanto, a exposição ao n-hexano nas concentrações de 88-352 mg/m³, não altera a disposição cinética e o metabolismo de ambos os enantiômeros do VER. Considerando o número limitado de animais investigados (n=6 para cada tempo de coleta) e a maior variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos do VER nos animais expostos ao n-hexano, estudos empregando maiores concentrações de n-hexano são necessários para confirmar a não interferência do n-hexano na disposição cinética e no metabolismo do VER.

O efeito do tolueno na atividade do CYP foi inicialmente investigado pela medida da atividade catalítica de monoxigenases específicas em frações microsomais de fígado de ratos machos Wistar. Wang et al (1993) reportam que ratos machos Wistar expostos ao tolueno por inalação (500-4000 ppm) durante 6 h manifestam aumento da atividade do CYP2B1/2, CYP2E1 e CYP3A1/2 e redução da atividade do CYP2C11/6. Gut et al (1993) também reportaram aumento do CYP2B1 e CYP2E1 e redução da atividade do CYP2A1 em ratos tratados com tolueno por inalação na dose de 4mg/L, 20h/dia durante 4 dias. Mais recentemente, isso tem sido confirmado através de medidas imunoquímicas usando anticorpos monoespecíficos contra subformas individuais do CYP. Nakajima e Wang (1994) descrevem que ratos expostos ao tolueno durante 6 h exibem indução do CYP2E1 a concentrações maiores que 1000 ppm e indução do CYP2B1/2 e do CYP3A1/2 a concentrações maiores que 2000 ppm e redução do CYP2C11/6 a concentrações de 4000 ppm.

O metabolismo do tolueno em fígado de ratos é dependente do CYP2E1, CYP2B1/2, CYP2C11 e CYP2C6 para a formação do álcool benzílico. O CYP2A1, CYP1A1/2 e CYP2C12 exibem pouca contribuição na formação desse metabólito. O CYP2E1 também contribui para a formação do *p*-cresol, mas não do *o*-cresol enquanto o CYP2B1, o CYP2C11 e o CYP1A1/2 catalizam a formação do *o*- e do *p*-cresol (NAKAJIMA e WANG, 1994).

Em microsomas de fígado humano o metabolismo do verapamil é dependente do CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C18, CYP2D6 e CYP2E1 (WALLES, 2001, BHATTI e FOSTER, 1997).

Com base nos dados apresentados o presente estudo avalia a influência do tolueno na disposição cinética e no metabolismo estereosseletivos do VER.

Os animais do grupo tolueno foram expostos em câmara de exposição a três diferentes concentrações de tolueno experimentadas com base no TLV-TWA de 50 ppm proposto pela ACGIH (2006). Os animais foram expostos às concentrações de 94 mg/m³, 188 mg/m³ ou 376 mg/m³ durante 6 h/dia, por 05 dias consecutivos, tendo sido tratados no quinto dia com dose única oral de cloridrato de verapamil racêmico.

A disposição cinética do VER para os animais do grupo tolueno expostos às concentrações de 94 mg/m³ e 188 mg/m³, demonstram perda da entantiossletividade com razões de $AUC^{0-\infty}_{S/R}$ de 1,1 e 1,4 respectivamente, para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³ e 188 mg/m³ (Tabelas 17 e 19). Embora a razão $AUC^{0-\infty}_{S/R}$ dos animais do grupo tolueno 376 mg/m³ seja igual a 1,9, esse grupo também apresentou perda da enantiosseletividade (Tabela 21).

Os parâmetros farmacocinéticos relativos aos enantiômeros do VER não mostram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os animais expostos ao tolueno nas concentrações 94, 188 e 376 mg/m³ (Tabela 25).

A perda da enantiosseletividade para os enantiômero do NOR também foi observada nos três grupos de animais tratados com tolueno nas diferentes concentrações (Tabelas 18, 20 e 22). Também não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os parâmetros farmacocinéticos dos enantiômeros do NOR para os animais do grupo controle e os animais expostos ao tolueno nas concentrações descritas (Tabelas 25 e 26).

O dado, embora, obtido com maior variabilidade em relação ao grupo controle, pode apresentar relevância considerando que os animais do grupo controle apresentaram concentrações plasmáticas do eutômero (-)-(S)-VER de, aproximadamente, o dobro das observadas para o (+)-(R)-VER. Ressalta-se que, 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 (ASAFUL-ADJAYE e SHIU, 1998; BHATTI e FOSTER, 1997; JOHNSON et al, 1995; PAGEL et al, 1998; LANKFORD e BAI, 1995; STAGNI e GILLESPIE, 1995).

Concluindo, os dados obtidos no presente estudo permitem inferir que a exposição ao n-hexano e ao tolueno, em concentrações iguais ou maiores que o TLV-TWA, resulta em perda da enantiosseletividade na disposição cinética do VER em ratos. No entanto, a exposição ao n-hexano nas concentrações de 88-352 mg/m³ ou a exposição ao tolueno nas concentrações 94-376 mg/m³ não alteram a

disposição cinética e o metabolismo de ambos os enantiômeros do VER. Considerando o número limitado de animais investigados ($n=6$ para cada tempo de coleta) e a maior variabilidade dos parâmetros farmacocinéticos do VER nos animais expostos ao n-hexano e ao tolueno, estudos empregando maiores concentrações de n-hexano são necessários para confirmar a não interferência dos solventes na disposição cinética e no metabolismo do VER.

6. CONCLUSÕES

- 1 – O método desenvolvido e validado para a análise dos enantiômeros do VER e do seu metabólito NOR em plasma de ratos, apresenta limites de confiança compatíveis com o estudo de estereosseletividade na farmacocinética do verapamil administrado a ratos em regime de dose única.
- 2 – A farmacocinética do verapamil é estereosseletiva em ratos do grupo controle observando-se acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-VER.
- 3 – A farmacocinética do verapamil é estereosseletiva em ratos do grupo n-hexano tratados com o solvente em câmara de exposição na concentração de 88 mg/m³ observando-se acúmulo plasmático do eutômero (-)-(S)-VER.
- 4 – A exposição dos animais ao n-hexano em câmara de exposição nas concentrações de 176 mg/m³ e 352 mg/m³ resulta em perda da enantiosseletividade na disposição cinética do VER em ratos.
- 5 – A exposição ao n-hexano nas concentrações de 88 mg/m³, 176 mg/m³ e 352 mg/m³ não altera a farmacocinética dos enantiômeros do VER administrado a ratos.
- 6 – A exposição ao tolueno nas concentrações de 94 mg/m³, 188 mg/m³ e 376 mg/m³ resulta em perda da enantiosseletividade na disposição cinética do VER em ratos.
- 7 – A exposição ao tolueno nas concentrações de 94 mg/m³, 188 mg/m³ e 376 mg/m³ não altera a farmacocinética dos enantiômeros do VER administrado a ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, D. R.; WAINER, I. W.; ANACLETO, A. I.; Verapamil metabolite exposure in older and younger men during steady-state oral verapamil administration. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 28, n. 7, p. 760-765, 2000.

AMERICAN OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Documentation of the TLVs and BIEs with other world wide occupational exposure values**, Cincinnati, 2006, 1 CD-ROM.

ASAFUL-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.

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.

BORGES, N. C. C.; MENDES, G. D.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; et al. Verapamil quantification in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. An application for bioequivalence study. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 827, p. 165-172, 2005.

BRANDSTETEROVÁ, E.; WAINER, I. W. Achiral and chiral high-performance liquid chromatography of verapamil and its metabolites in serum samples. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 732, p. 395-404, 1999.

BRESSOLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAM, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 686, p. 3-10, 1996.

BRUCKNER, J. V.; WARREN, D. A. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLAASSEN, C. D.; ANDUR, M. O.; DOULL, J. **Casarett & Doull's Toxicology. The basic Science of Poisons**. 5 ed., New York: McGraw-Hill, 1996, p. 869-915.

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

CALDWELL, J. The importance of Stereochemistry in drug action and disposition. **Journal of Clinical Pharmacology**, Stamford, v. 32, p. 925-929, 1992.

CAMPO, P.; LOQUET, G.; BLACHÈRE, V.; et al. Toluene and styrene intoxication route in the rat cochlea. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 21, n. 4, p. 427-434, 1999.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHU, Y. Q.; WAINER, I. W. Determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in serum using coupled achiral-chiral high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Bethesda, v. 497, p. 191-200, 1989.

CROSBIE, S. J.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M. Metabolism of n-hexane by rat liver and extrahepatic tissues and the effect of cytochrome P-450 inducers. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 16, n. 3, p. 131-137, 1997.

DARBAR, D.; FROMM, M. F.; DELL'ORTO S.; et al. Modulation by dietary salt of verapamil disposition in humans. **Circulation**, Dallas, v. 98, p. 2702-2708, 1998.

DILGER, K.; ECKHARDT, K.; HOFMANN, U.; et al. Chronopharmacology of intravenous and oral modified release verapamil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 47, p. 413-419, 1999.

EICHELBAUM, M. Side effects and toxic reactions of chiral drugs: a clinical perspective. **Archives of Toxicology - Supplement**, Berlin, v. 17, p. 514-521, 1995.

GARDNER, R. A statistical analysis of data on exposure to xylene at selected workplaces in the U. K. **The Annals of Occupational Hygiene**, New York, v. 40, n. 4, p. 411-422, 1996.

GUT, I.; TELELIUS, Y.; FRANTIK, E.; et al. Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450B1 and P450E1 in rat liver. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 67, p. 237-243, 1993.

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

HASS, U.; LUND, S. P.; HOUGAARD, K. S. Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v. 21, n. 4, p. 349-357, 1999.

HEDELAND, M.; FREDRIKSSON, E.; LENNERNÄS, H.; et al. Simultaneous quantification of the enantiomers of verapamil and its n-demethylated metabolite in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 804, p. 303-311, 2004.

HUTZLER, J. M.; TRACY, T. S. Atypical kinetic profile in drug metabolism reactions. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 30, n. 4, p. 355-362, 2002.

INGELMAN-SUNDERBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P-450 drug metabolism for drug development. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 29, n. 4, p. 570-573, 2001.

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.

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

KROEMER, H. K.; FROMM, M. F.; Einchelbaum, M. Stereoselectivity in drug metabolism and action effects of enzyme inhibition and induction. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 18, n. 4, p. 388-392, 1996.

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

LEHMAN-MCKEEMAN, L. D.; CAUDILL, D.; VASSALLO, J. D. Effects of xylene and musk ketone on rat hepatic cytochrome P450 enzymes. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 111, p. 105-115, 1999.

LEITE, E. M. A. Solventes orgânicos. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2 ed. , São Paulo: Atheneu Editora, 2003, p. 175-216.

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

MANINI, P.; ANDREOLI, R.; MUTTI, A.; ET AL. Determination of free and glucoronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 108, p. 225-231, 1999.

MATEUS, F. H.; Estereosseletividade na disposição cinética do verapamil em ratos expostos à acetoneitrila. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área Toxicologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

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

MEHVAR, R.; REYNOLDS, J.; Input rate-dependent stereoselective pharmacokinetics. Experimental evidence in verapamil-infused isolated rat livers. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 23, n. 6, p. 637-641, 1995.

NAKAJIMA, T.; WANG, R.; ELOVAARA, E.; et al. Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 53, P 271-277, 1997.

ODA, Y.; ASAKAWA, N.; KAJIMA, T.; et al. On-line determination and resolution of verapamil enantiomers by high-performance liquid chromatography with column switch. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 541, p. 411-418, 1991.

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

ROBERTS, L. G.; NICOLICH, M. J.; SCHREINER, C. A. Developmental and reproductive toxicity of toluene vapor in the rat II. Developmental toxicity. **Reproductive Toxicology**, New York, *In press*, 2007.

SANTOS, C. R.; PASSARELLI, M.; M.; NASCIMENTO, E. S. Evaluation of 2,5-hexanedione in urine of workers exposed to n-hexane in Brazilian shoe factories. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 708, p. 237-244, 2002.

SHIBUKAWA, A.; WAINER, I. W.; Simultaneous direct determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in plasma using a derivatized amylose high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 574, p. 85-92, 1992.

SORIANO, T.; MENEDEZ, M.; SANZ, P. Method for the simultaneous quantification of n-hexane metabolites: application to n-hexane metabolism determination. **Human & Experimental Toxicology**, Houndmills, v. 15, n. 6, p. 497-503, 1996.

STAGNI, 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.

SUN, L.; ZHANG, S.; ZHONG, D. *In vitro* identification of metabolites of verapamil in rat liver microsomes. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 25, n. 1, p. 121-128, 2004.

TANG, C.; SHOU, M.; RODRIGUE, A. D. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450C9 (CYP2C9) activity. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 5, n. 28, p. 565-572, 2000.

TRACY, T. S.; KORZEKWA, K., R.; GONZALEZ, F. J.; et al. Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 47, p. 545-552, 1999.

TSUGA, H.; HONMA, T. Effects of short-term toluene exposure on ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors in the rat frontal cortex and hippocampus, **Neurotoxicology and Teratology**, New York, v.22, p. 603-606, 2000.

VAN ENGELN, J. G. M.; HAAN, W. R.; OPDAM, J. J. G.; et al. Effect of coexposure to methyl ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 144, p. 385-395, 1997.

VOHRA, K.; GAIND, V. S.; Gas chromatographic determination of 2,5 hexanedione in urine as an indicator of exposure to n-hexane. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v. 16, p. 176-178, 1992.

VON RICHTER, O.; EICHELBAUM, M.; SCHÖBERGER, F.; et al. Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [$^2\text{H}_7$] verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 38, p. 137-147, 2000.

WALLES, M.; THUM, T.; LEVSEN, K.; et al. Metabolism of verapamil: 24 new phase I and phase II metabolites indentified in cell cultures of rats hepatocytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, Amsterdam, v. 798, p. 265-274, 2003.

WANG, R. S.; NAKAJIMA, T.; PARK, S. S.; et al. Monoclonal antibody-directed assessment of toluene induction of rat hepatic cytochrome P450 isozymes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 46, p. 413-419, 1993.

ZANIDIP. O antagonista de cálcio que faz a diferença. Asta Medica, São Paulo, 154 p, 1999.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 16/2004 – Animais em Pesquisa

Interessado: FABIANO HENRIQUE MATEUS

Orientador: Profa. Dra. VERA LÚCIA LANCHOTE

Projeto: Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivo do verapamil em ratos

Parecer nº 39/2004 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivo do verapamil em ratos", estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e é de PARECER FAVORÁVEL à sua execução.

Araraquara, 16 de agosto de 2004.

Profª. Drª. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI
Coordenadora do CEP

ANEXO 2

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo controle. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	135,1	235,7	262,7	354,6	239,0	263,5
Cmax (ng/mL)	38,8	62,1	52,0	77,8	84,0	87,0
Tmax (h)	1,4	1,5	1,9	1,7	1,1	0,7
ka (h ⁻¹)	0,8	0,7	0,5	0,6	1,7	3,1
t _{1/2a} (h)	0,9	1,0	1,3	1,2	1,1	1,0
kel (h ⁻¹)	0,8	0,7	0,5	0,6	0,6	0,5
t _{1/2} (h)	0,9	1,0	1,3	1,2	1,1	1,5
Cl/F (L/h)	37,0	21,2	19,4	14,1	20,9	19,0
Vd/F (L kg ⁻¹)	47,4	29,6	35,5	23,8	33,3	41,2

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo controle. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	80,7	112,7	134,6	109,6	128,2	203,6
Cmax (ng/mL)	25,3	44,3	37,0	40,5	39,6	63,3
Tmax (h)	1,4	1,3	1,5	2,0	1,3	1,4
ka (h ⁻¹)	0,9	1,6	0,8	1,0	0,8	1,0
t _{1/2a} (h)	0,8	0,5	0,9	0,7	0,8	0,7
kel (h ⁻¹)	0,9	0,8	0,8	1,0	0,8	0,7
t _{1/2} (h)	0,8	0,9	0,9	0,7	0,8	1,0
Cl/F (L/h)	62,0	44,3	37,2	45,6	39,6	24,6
Vd/F (L kg ⁻¹)	73,0	56,2	49,5	45,4	46,5	34,0

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo controle. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h.mL ⁻¹)	103,4	70,1	70,6	58,1	72,3	75,3
Cmax (ng/mL)	35,2	30,5	25,4	17,1	22,3	38,2
Tmax (h)	1,5	2,6	1,9	1,3	1,6	1,9
kf (h ⁻¹)	0,9	1,2	1,0	0,8	0,8	4,2
t1/2f (h)	0,7	0,6	0,7	0,9	0,8	0,2
kel (h ⁻¹)	0,9	1,2	1,0	0,8	0,8	0,7
t _{1/2} (h)	0,8	0,6	0,7	0,9	0,8	0,9

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo controle. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
$AUC^{0-\infty}$ (ng.h.mL ⁻¹)	57,7	68,6	63,5	43,3	39,0	46,9
Cmax (ng/mL)	18,4	14,0	20,1	14,0	13,6	17,8
Tmax (h)	1,2	1,8	1,2	1,45	1,3	1,0
kf (h ⁻¹)	0,9	0,6	0,9	0,9	1,0	1,0
t1/2f (h)	0,8	1,2	0,8	0,7	0,7	0,7
kel (h ⁻¹)	0,9	0,6	0,9	0,8	1,0	1,0
t _{1/2} (h)	0,8	1,3	0,8	0,8	0,7	0,7

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	122,0	164,9	323,1	244,1	309,9	168,7
Cmax (ng/mL)	28,5	29,7	111,6	25,7	65,7	26,3
Tmax (h)	1,6	2,0	1,0	3,5	1,7	2,4
ka (h ⁻¹)	0,6	0,5	4,9	0,3	0,4	0,6
t _{1/2a} (h)	1,1	1,4	0,1	2,4	1,2	1,7
kel (h ⁻¹)	0,6	0,5	0,4	0,3	0,4	0,6
t _{1/2} (h)	1,1	1,4	1,6	2,4	1,2	1,6
Cl/F (L/h)	41,0	30,3	15,5	20,5	16,1	29,6
Vd/F (L kg ⁻¹)	64,9	61,8	35,3	71,6	69,2	28,1

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	51,1	71,2	58,2	168,7	116,5	-
Cmax (ng/mL)	23,2	24,1	13,1	52,4	36,8	-
Tmax (h)	1,3	1,9	1,8	1,4	1,2	-
ka (h ⁻¹)	8,0	1,0	0,6	0,8	0,6	-
t _{1/2a} (h)	0,1	0,7	1,1	0,9	1,2	-
kel (h ⁻¹)	0,6	0,9	0,6	0,7	0,8	-
t _{1/2} (h)	1,3	0,8	1,2	1,4	1,2	-
Cl/F (L/h)	97,8	70,3	85,8	26,1	29,2	-
Vd/F (L kg ⁻¹)	17,7	79,5	14,2	48,9	61,3	-

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	117,3	67,9	206,7	199,6	24,3	-
Cmax (ng/mL)	23,5	11,1	24,9	58,3	7,6	-
Tmax (h)	2,0	2,3	3,1	2,1	1,6	-
kf (h ⁻¹)	0,5	0,4	0,3	0,8	0,9	-
t1/2f (h)	1,3	1,6	2,1	0,9	0,8	-
kel (h ⁻¹)	0,5	0,4	0,3	0,8	0,8	-
t _{1/2} (h)	1,3	1,6	2,1	0,9	0,8	-

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo n-hexano 88 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	74,5	96,3	47,1	37,6	49,1	-
Cmax (ng/mL)	7,4	28,8	10,2	31,7	19,6	-
Tmax (h)	3,8	1,2	3,5	1,3	1,1	-
kf (h ⁻¹)	0,3	0,8	0,6	0,8	0,6	-
t1/2f (h)	2,5	0,8	1,2	0,9	0,6	-
kel (h ⁻¹)	0,3	0,8	0,6	0,9	0,9	-
t _{1/2} (h)	2,7	0,9	1,2	0,7	0,9	-

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	128,4	185,1	265,7	348,5	430,4	203,1
Cmax (ng/mL)	32,5	48,0	47,0	90,2	132,3	65,3
Tmax (h)	1,6	1,5	2,1	1,6	1,3	1,8
ka (h ⁻¹)	0,7	0,7	0,5	0,7	0,8	1,8
t _{1/2a} (h)	1,0	1,0	1,4	1,0	0,8	0,4
kel (h ⁻¹)	0,7	0,7	0,5	0,7	0,8	0,5
t _{1/2} (h)	1,0	1,0	1,4	1,0	0,8	1,3
Cl/F (L/h)	38,9	27,0	18,8	14,3	11,6	24,6
Vd/F (L kg ⁻¹)	56,7	38,3	39,1	20,4	13,9	45,4

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	79,7	99,4	141,3	113,5	101,6	-
Cmax (ng/mL)	34,8	33,5	41,6	20,1	21,0	-
Tmax (h)	2,0	1,3	1,3	2,1	2,4	-
ka (h ⁻¹)	2,6	0,9	0,8	0,5	0,6	-
t _{1/2a} (h)	0,3	0,8	0,9	1,4	1,2	-
kel (h ⁻¹)	0,7	0,9	0,8	0,5	0,6	-
t _{1/2} (h)	1,0	0,8	0,9	1,5	1,2	-
Cl/F (L/h)	62,8	50,3	35,4	44,1	49,2	-
Vd/F (L kg ⁻¹)	87,4	55,1	44,2	92,6	87,2	-

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	114,9	79,4	103,1	129,7	138,4	234,6
Cmax (ng/mL)	28,4	19,1	25,9	38,7	30,2	64,7
Tmax (h)	1,9	1,9	2,3	2,1	2,4	1,4
kf (h ⁻¹)	0,7	0,7	0,7	0,8	0,6	2,1
t1/2f (h)	1,0	1,1	1,0	0,9	1,2	0,3
kel (h ⁻¹)	0,7	0,7	0,7	0,8	0,6	0,4
t _{1/2} (h)	1,0	1,1	1,0	0,9	1,2	1,7

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo n-hexano 176 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	34,8	74,4	57,2	58,2	99,9	106,9
Cmax (ng/mL)	14,9	11,9	28,5	23,1	38,8	36,8
Tmax (h)	2,2	2,4	2,1	3,4	1,8	1,5
kf (h ⁻¹)	1,2	0,5	1,4	3,1	1,4	1,0
t1/2f (h)	0,6	1,5	0,5	0,2	0,5	0,7
kel (h ⁻¹)	1,1	0,4	1,3	0,6	0,8	0,9
t _{1/2} (h)	0,6	1,7	0,5	1,2	0,8	0,8

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	269,1	235,8	160,2	425,0	274,1	306,8
Cmax (ng/mL)	72,8	98,8	61,3	126,6	75,5	112,5
Tmax (h)	1,6	1,2	1,0	1,2	1,4	2,4
ka (h ⁻¹)	0,7	1,5	1,0	0,8	0,7	0,9
t _{1/2a} (h)	1,0	0,5	0,7	0,8	0,9	0,7
kel (h ⁻¹)	0,8	0,9	1,0	0,8	0,7	0,9
t _{1/2} (h)	0,9	0,8	0,7	0,9	0,9	0,7
Cl/F (L/h)	18,6	21,2	31,2	11,8	18,2	15,3
Vd/F (L kg ⁻¹)	24,7	23,7	30,1	14,7	24,7	16,2

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	92,9	109,9	193,2	157,4	122,5	33,1
Cmax (ng/mL)	19,6	38,9	72,3	27,9	32,8	17,1
Tmax (h)	1,7	1,2	1,3	2,1	1,6	1,9
ka (h ⁻¹)	0,6	1,0	1,1	0,5	0,7	3,2
t _{1/2a} (h)	1,2	0,7	0,6	1,4	1,0	0,2
kel (h ⁻¹)	0,6	1,0	1,0	0,5	0,7	0,8
t _{1/2} (h)	1,2	0,7	0,7	1,4	1,0	0,8
Cl/F (L/h)	53,8	25,9	25,9	27,9	40,8	151,0
Vd/F (L kg ⁻¹)	93,9	26,9	26,9	66,2	56,2	183,3

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	125,0	217,1	116,4	112,8	79,1	-
Cmax (ng/mL)	29,9	25,2	51,4	8,2	16,5	-
Tmax (h)	1,9	3,3	0,8	1,3	1,5	-
kf (h ⁻¹)	0,7	0,4	1,2	0,9	0,6	-
t1/2f (h)	1,1	1,6	0,6	0,8	0,9	-
kel (h ⁻¹)	0,7	0,2	1,2	0,9	0,8	-
t _{1/2} (h)	1,1	2,9	0,6	0,8	0,7	-

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo n-hexano 352 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	52,9	53,6	52,7	72,1	90,7	65,8
Cmax (ng/mL)	11,7	10,5	13,9	23,8	33,1	26,8
Tmax (h)	1,8	2,2	1,6	2,3	2,2	1,1
kf (h ⁻¹)	0,6	0,5	0,7	0,9	0,7	1,1
t1/2f (h)	1,2	1,3	1,0	0,8	1,0	0,6
kel (h ⁻¹)	0,6	0,5	0,7	0,9	1,7	1,1
t _{1/2} (h)	1,1	1,3	1,0	0,8	0,4	0,6

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	146,9	196,5	383,8	206,9	510,0	636,6
Cmax (ng/mL)	33,2	51,5	86,1	48,7	201,8	147,1
Tmax (h)	1,7	1,5	1,8	1,8	1,8	1,3
ka (h ⁻¹)	0,6	0,7	0,6	0,7	9,4	1,3
t _{1/2a} (h)	1,1	1,0	1,1	1,0	0,1	0,5
kel (h ⁻¹)	0,6	0,7	0,6	0,6	0,5	0,4
t _{1/2} (h)	1,1	1,0	1,1	1,1	1,5	1,8
Cl/F (L/h)	34,0	25,4	13,0	24,2	9,8	7,9
Vd/F (L kg ⁻¹)	56,3	35,7	21,4	39,1	21,2	20,1

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	49,6	295,9	107,9	277,8	473,9	-
Cmax (ng/mL)	18,3	36,7	37,9	86,5	99,8	-
Tmax (h)	1,3	3,0	1,3	1,4	1,9	-
ka (h ⁻¹)	1,4	0,3	1,0	0,9	0,6	-
t _{1/2a} (h)	0,5	2,0	0,7	0,8	1,2	-
kel (h ⁻¹)	0,8	0,3	0,9	0,8	0,6	-
t _{1/2} (h)	0,9	2,1	0,7	0,8	1,2	-
Cl/F (L/h)	100,8	16,9	46,3	18,0	10,6	-
Vd/F (L kg ⁻¹)	132,0	51,0	49,0	21,4	18,4	-

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	62,8	82,1	73,4	64,9	176,5	-
Cmax (ng/mL)	19,8	25,3	18,8	30,0	31,7	-
Tmax (h)	2,4	2,2	1,6	1,6	2,1	-
kf (h ⁻¹)	0,9	2,6	0,7	2,4	0,5	-
t1/2f (h)	0,8	0,3	1,0	0,3	1,4	-
kel (h ⁻¹)	0,9	0,4	0,7	0,8	0,5	-
t _{1/2} (h)	0,8	1,6	1,0	0,9	1,4	-

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo tolueno 94 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	23,8	40,3	21,0	44,0	89,5	-
Cmax (ng/mL)	9,4	9,4	8,9	11,6	23,8	-
Tmax (h)	1,8	1,6	2,5	2,3	1,2	-
kf (h ⁻¹)	1,1	0,6	3,4	0,7	0,6	-
t1/2f (h)	0,6	1,1	0,2	1,0	0,9	-
kel (h ⁻¹)	1,1	0,6	0,6	0,7	0,9	-
t _{1/2} (h)	0,7	1,1	1,1	1,0	0,9	-

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	203,0	292,4	300,2	196,4	900,9	-
Cmax (ng/mL)	78,2	106,3	92,2	24,3	250,6	-
Tmax (h)	1,4	1,4	2,1	3,0	1,5	-
ka (h ⁻¹)	1,0	1,0	0,8	0,3	0,8	-
t _{1/2a} (h)	0,7	0,7	0,8	2,0	0,9	-
kel (h ⁻¹)	0,7	1,0	0,8	0,3	0,8	-
t _{1/2} (h)	1,0	0,7	0,8	2,0	0,9	-
Cl/F (L/h)	24,6	17,1	16,7	25,5	5,5	-
Vd/F (L kg ⁻¹)	23,6	17,4	19,9	76,2	73,0	-

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	140,7	106,6	345,2	171,5	38,8	135,5
Cmax (ng/mL)	26,9	21,6	81,2	33,7	18,0	47,9
Tmax (h)	1,9	1,8	1,9	2,1	2,1	3,3
ka (h ⁻¹)	0,5	0,6	0,6	0,5	1,3	1,2
t _{1/2a} (h)	1,3	1,3	1,1	1,3	0,5	0,6
kel (h ⁻¹)	0,5	0,5	0,6	0,5	1,3	0,8
t _{1/2} (h)	1,3	1,3	1,1	1,3	0,6	0,9
Cl/F (L/h)	35,5	46,9	14,5	29,2	129,0	36,9
Vd/F (L kg ⁻¹)	68,1	85,5	22,6	54,5	102,9	48,0

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	83,8	46,5	158,5	27,7	86,8	-
Cmax (ng/mL)	23,1	20,7	68,7	10,1	12,6	-
Tmax (h)	1,5	1,1	1,2	1,8	2,5	-
kf (h ⁻¹)	0,8	1,2	10,8	1,0	0,4	-
t1/2f (h)	0,9	0,6	0,1	0,7	1,8	-
kel (h ⁻¹)	0,7	1,2	0,5	1,0	0,4	-
t _{1/2} (h)	0,9	0,6	1,4	0,7	1,7	-

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo tolueno 188 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	96,8	90,9	27,4	107,6	71,5	-
Cmax (ng/mL)	12,9	18,2	15,7	44,9	21,0	-
Tmax (h)	2,8	1,4	2,0	2,3	3,6	-
kf (h ⁻¹)	0,4	0,8	1,6	1,1	0,8	-
t1/2f (h)	1,9	0,8	0,4	0,6	0,9	-
kel (h ⁻¹)	0,4	0,8	1,6	1,1	0,8	-
t _{1/2} (h)	1,9	0,8	0,4	0,6	0,9	-

Disposição cinética do (-)-(S)-VER para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	228,5	220,1	296,0	321,5	379,2	341,6
Cmax (ng/mL)	38,0	40,6	48,2	60,8	82,8	54,5
Tmax (h)	2,3	2,0	2,3	1,8	1,6	2,3
ka (h ⁻¹)	0,5	0,5	0,4	0,8	1,0	0,5
t _{1/2a} (h)	1,5	1,4	1,6	0,9	0,7	1,5
kel (h ⁻¹)	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
t _{1/2} (h)	1,5	1,4	1,6	1,9	1,7	1,7
Cl/F (L/h)	21,9	22,7	16,9	15,5	13,2	14,6
Vd/F (L kg ⁻¹)	48,3	45,4	38,2	42,7	32,4	35,6

Disposição cinética do (+)-(R)-VER para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng h mL ⁻¹)	121,2	129,7	149,2	64,6	144,1	-
Cmax (ng/mL)	16,0	23,7	28,3	23,5	25,2	-
Tmax (h)	2,8	2,0	1,9	1,0	2,9	-
ka (h ⁻¹)	0,4	0,5	0,5	1,0	0,5	-
t _{1/2a} (h)	2,0	1,4	1,3	0,7	1,5	-
kel (h ⁻¹)	0,4	0,5	0,5	1,0	0,5	-
t _{1/2} (h)	1,9	1,4	1,4	0,7	1,5	-
Cl/F (L/h)	41,3	38,5	33,5	77,4	34,7	-
Vd/F (L kg ⁻¹)	113,3	77,3	65,3	78,0	73,2	-

Disposição cinética do (S)-NOR para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	167,3	189,3	51,9	194,2	119,0	-
Cmax (ng/mL)	31,1	46,2	14,8	56,4	44,1	-
Tmax (h)	2,1	1,6	1,5	1,9	3,3	-
kf (h ⁻¹)	0,5	0,7	0,8	0,9	1,0	-
t1/2f (h)	1,3	1,0	0,9	0,6	0,6	-
kel (h ⁻¹)	0,5	0,7	0,8	0,3	0,9	-
t _{1/2} (h)	1,4	1,0	0,9	1,1	0,7	-

Disposição cinética do (R)-NOR para os animais do grupo tolueno 376 mg/m³. Dados obtidos após análise farmacocinética no *software* WinNonlin.

Animal	1	2	3	4	5	6
AUC ^{0-∞} (ng.h.mL ⁻¹)	62,8	36,7	57,6	97,5	136,8	-
Cmax (ng/mL)	18,9	21,1	19,6	21,0	15,2	-
Tmax (h)	2,2	1,8	1,4	1,7	3,3	-
kf (h ⁻¹)	2,5	8,4	0,9	0,6	0,3	-
t1/2f (h)	0,3	0,1	0,7	1,2	2,3	-
kel (h ⁻¹)	0,4	0,7	0,9	0,6	0,3	-
t _{1/2} (h)	1,6	1,0	0,7	1,2	2,3	-