



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



MARIANA MAURO

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO TOLUENO POR
INALAÇÃO NA ATIVIDADE *IN VIVO* DOS
TRANSPORTADORES DA FAMÍLIA Oatp EM RATOS**

Araraquara - SP
2016

MARIANA MAURO

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO TOLUENO POR
INALAÇÃO NA ATIVIDADE *IN VIVO* DOS
TRANSPORTADORES DA FAMÍLIA Oatp EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientador: Prof. Dr. José Salvador Lepera

Araraquara - SP
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M457i Mauro, Mariana
Influência da exposição ao tolueno por inalação na atividade *In Vivo* dos transportadores da família Oatp em ratos / Mariana Mauro. – Araraquara, 2016.
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Natalia Valadares de Moraes.
Coorientador: José Salvador Lepera.

1. Tolueno. 2. Transportadores da família Oatp. 3. Pravastatina. 4. Farmacocinética.
I. Moraes, Natalia Valadares de, orient. II. Lepera, José Salvador, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

MARIANA MAURO

INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO AO TOLUENO POR INALAÇÃO NA ATIVIDADE
IN VIVO DOS TRANSPORTADORES DA FAMÍLIA OATP EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista - UNESP,
Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Mestre(a) em Ciências
Farmacêuticas

Araraquara, 20 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

NATÁLIA VALADARES DE MORAES – Orientadora

JONAS AUGUSTO RIZZATO PASCHOAL

HELEN MARIANA BALDAN CIMATTI

Dedico este trabalho aos meus pais
Marisa Ap. Delalibera Mauro e José Mauro
e aos meus irmãos
Junior, Renato e Fabiana
por todo o apoio, carinho, amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu coragem e força para realizar mais esta etapa na minha vida.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dr. Natália Valadares de Moraes por ter confiado no meu trabalho, pela dedicação e por todos os ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Salvador Lepera que esteve sempre presente, guiando este trabalho da melhor forma possível, transmitindo seu conhecimento.

Aos professores Amanda Martins Baviera e Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos funcionários do laboratório de toxicologia Maria, em especial Valéria e Vinícius por toda a ajuda, dedicação e amizade.

Aos amigos do grupo e da vida Jhohann e Priscila por toda a ajuda, dedicação, amizade e troca de experiências e a Bianca e Bruno pelo companheirismo e auxílio.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade e apoio financeiro e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao meu namorado Rafael por estar sempre ao meu lado, pelo seu apoio, confiança, paciência, amor e carinho.

A minha amiga Fabiane pelo companheirismo, paciência e principalmente sua amizade.

Agradeço a todos que participaram desta etapa da minha vida. Muito obrigada.

A vida me ensinou

A vida me ensinou...
A dizer adeus às pessoas que amo, sem tira-las do meu coração
Sorrir às pessoas que não gostam de mim, para mostra-las que sou diferente do que elas pensam
Fazer de conta que tudo está bem quando isso não é verdade, para que eu possa acreditar que tudo vai mudar
Calar-me para ouvir e aprender com meus erros, afinal eu posso ser sempre melhor.
A vida me ensinou...
A lutar contra as injustiças
Sorrir quando o que mais desejo é gritar todas as minhas dores para o mundo
A ser forte quando os que amo estão com problemas
Ser carinhoso com todos que precisam do meu carinho
Ouvir a todos que só precisam desabafar
Amar aos que me machucam ou querem fazer de mim depósito de suas frustrações e desafetos
Perdoar incondicionalmente, pois já precisei desse perdão
Amar incondicionalmente, pois também preciso desse amor
A alegrar a quem precisa
A pedir perdão
A sonhar acordado
A acordar para a realidade
A aproveitar cada instante de felicidade
A chorar de saudade sem vergonha de demonstrar
Me ensinou a ter olhos para “ver e ouvir estrelas”, embora nem sempre consiga entendê-las
A ver o encanto do pôr-do-sol
A sentir a dor do adeus e do que se acaba, sempre lutando para preservar tudo o que é importante para a felicidade do meu ser
A abrir minhas janelas para o amor
A não temer o futuro
Me ensinou e esta me ensinando a aproveitar o presente, como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo tenho que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.

"Charles Chaplin"

RESUMO

A exposição ocupacional a agentes químicos é potencialmente capaz de modificar a disposição cinética ou o metabolismo de fármacos, principalmente em função da indução ou inibição de enzimas do sistema citocromo P450. Entretanto, estudos que mostram o efeito da exposição ocupacional a agentes químicos na atividade de transportadores de fármacos são escassos. O tolueno está presente no ambiente de trabalho principalmente na forma de vapor. Neste ambiente, o solvente é absorvido principalmente por inalação. O objetivo do estudo é avaliar a influência da exposição inalatória ao tolueno na atividade *in vivo* do polipeptídeo transportador de ânions orgânicos da família Oatp em ratos, empregando como fármaco marcador a pravastatina. Ratos machos *Wistar* (n=6 por tempo de coleta, por grupo) foram expostos ao tolueno (85 mg/m³) por inalação ou ao ar em câmara de exposição apenas pelo nariz por 6 horas/dia, 5 dias/semana, 4 semanas. Ao final do período de exposição, os animais receberam dose única de pravastatina (20 mg/kg) por via oral. Amostras seriadas de sangue foram coletadas até 8 horas após a administração de pravastatina. As concentrações plasmáticas do fármaco foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (LC-MS). O método de análise da pravastatina por LC-MS mostrou detectabilidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética após dose única em ratos. As áreas sob as curvas de concentração plasmática *versus* tempo (ASC) foram calculadas do tempo zero a infinito com base na Quadratura de Gauss-Laguerre. As concentrações de pravastatina correspondentes aos tempos avaliadas foram estimadas por interpolação polinomial. O clearance total aparente (CL/F) foi calculado a partir da equação: $CL/F = \text{dose}/ASC^{0-\infty}$. Na avaliação da disposição cinética da pravastatina, os animais não expostos ao tolueno apresentaram $ASC^{0-\infty}$ de 726 ng h/mL e CL/F de 49,1 L/h kg. Não houve diferença estatística na $ASC^{0-\infty}$ ao comparar os animais expostos ($ASC^{0-\infty}$: 681,8 ng h/mL) e não expostos ao tolueno. Os resultados do estudo permitem concluir que a atividade de transportadores Oatp, avaliada pelo uso da pravastatina como fármaco marcador, não foi alterada após a exposição ao tolueno por inalação a 85 mg/m³, 6 horas/dia, 5 dias/semana, 4 semanas em ratos.

Palavras-chave: Tolueno. Transportadores da família Oatp. Pravastatina. Farmacocinética.

ABSTRACT

Occupational exposure to chemical agents is potentially able to modify the kinetic disposition of drug metabolism, mainly due to the induction or inhibition of cytochrome P450 enzymes. However, studies investigating the influence of occupational exposure to chemicals on the variability in drug response are rare. Toluene is present in the working environment particularly in vapor form. In this environment, the toluene is mainly absorbed by inhalation. Considering that, the aim of this study was evaluate the influence of inhalation to toluene in the *in vivo* activity of the polypeptide transporter organic anion (Oatp) family transporters in rats, using pravastatin as a probe drug. Male Wistar rats (n=6, for each sampling time) were exposed to toluene (85 mg / m³) by inhalation or air in a nose only exposure system for 6 hours/day, 5 days/week, during 4 weeks. After 4 weeks of exposure, animals received a single dose of pravastatin (20 mg/kg) orally. Serial blood samples were collected up to 8 hours after administration of pravastatin. Plasma concentrations of pravastatin were measured by high-performance liquid chromatography with detection by mass spectrometry (LC-MS). The analysis method of pravastatin by LC-MS showed detectability, precision and accuracy compatible with the application in kinetic disposition studies after single doses in rats. The areas under the plasma concentration versus time (AUC) were calculated by zero to the infinity by the Gauss-Laguerre Quadrature. The concentrations corresponding to the times were estimated by polynomial interpolation. The total clearance apparent (CL/F) was calculated from the equation: $CL/F = \text{dose}/AUC^{0-\infty}$. In assessing the kinetics of pravastatin disposition, animals not exposed to toluene showed $AUC^{0-\infty}$ of 726 ng h/mL and CL/F of 49.1 L/h kg. There was no statistical difference in $AUC^{0-\infty}$ to compare the exposed animals ($AUC^{0-\infty}$: 681.8 ng h/mL) and not exposed to toluene. The results of this study showed that Oatp family transporters activity, assessed by the use of pravastatin as a marker drug, was not altered after exposure to toluene by inhalation at 85 mg/m³ 6 hours/day, 5 days/week and for 4 weeks in rats.

Keywords: Toluene. Oatp family transporters. Pravastatin. Pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do tolueno.....	2
Figura 2 – Localização do transportador de ânions orgânicos 1B1 (OATP1B1).....	9
Figura 3 – Principais vias de biotransformação da pravastatina.....	10
Figura 4 – Câmara para exposição simultânea de até 42 animais apenas pelo nariz (tipo <i>NOES</i>), com contentores acoplados.....	13
Figura 5 – Sistema de Infusão do solvente na câmara de exposição do tipo <i>NOES</i>	14
Figura 6 – Preparo dos animais para o protocolo experimental.	18
Figura 7 – Procedimento de extração líquido-líquido da pravastatina em plasma de rato.	21
Figura 8 – Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS.	29
Figura 9 – Linearidade do método.....	32
Figura 10 – Curva analítica da pravastatina em plasma de ratos utilizando a transformação log-log dos valores de x e y seguida da regressão linear.	33
Figura 11 – Concentrações plasmáticas da pravastatina em ratos tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg (grupo Controle-Pravastatina).	37
Figura 12 – Concentrações plasmáticas da pravastatina em ratos tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg (grupo Tolueno-Pravastatina).	37
Figura 13 – Curvas da concentração plasmática <i>versus</i> tempo dos grupos Controle-Pravastatina (○) e Tolueno-Pravastatina (●).....	38
Figura 14 – Parâmetros farmacocinéticos $ASC^{0-\infty}$ (A) e Cl/F (B) da pravastatina nos animais do grupo Controle-Pravastatina e do grupo Tolueno-Pravastatina.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da exposição ao tolueno nas enzimas do metabolismo e na disposição cinética de fármacos.....	4
Tabela 2 – Fármacos substratos de OATP1B1.....	6
Tabela 3 – Efeito matriz na análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS.	30
Tabela 4 – Curva analítica para a quantificação da pravastatina em plasma de ratos por LC–MS após transformação log-log seguida da regressão linear. ...	33
Tabela 5 – Limites de confiança do método de análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS.	35
Tabela 6 – Disposição cinética da pravastatina nos animais dos grupos controle e tolueno (n=6, para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média, mediana e erro padrão da média.	39
Tabela 7 – Disposição cinética da pravastatina em ratos tratados com dose única oral.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCB1 – *ATP binding cassette, subfamília B, membro 1*

ACGIH – *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*

AHH – arilhidrocarboneto hidroxilase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASBT – transportador apical de sais biliares dependente de sódio

ASC – área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo

ASC^{0-∞} – área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo zero até o infinito

BCRP – proteína de resistência ao câncer de mama

BSEP – bomba exportadora de sais biliares

Cl/F – clearance total aparente

CV – coeficiente de variação

C_{máx} – concentração plasmática máxima

CQA – controle de qualidade de alta concentração

CQB – controle de qualidade de baixa concentração

CQD – controle de qualidade de diluição

CQM – controle de qualidade de média concentração

CYP – sistema citocromo P450

EPM – erro padrão da média

EPR – erro padrão relativo

FMN – fator de matriz normalizado

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

i.p. – intraperitoneal

I.V. – intravenosa

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada com espectrômetro de massas

LEO – limite de exposição ocupacional

LIQ – limite inferior de quantificação

LSQ – limite superior de quantificação

MATE – proteína de extrusão de fármacos e toxinas

MCT – transportador de ácido monocarboxílico

MRP – proteína de resistência a múltiplos fármacos
MS – espectrômetro de massas
m/z – razão massa/carga
NOES – Nose Only Exposure System
NR – Norma Regulamentadora
NTCP – polipeptídeo co-transportador taurocolato de sódio
OATP – transportadores de ânions orgânicos
OCT – transportador de cátions orgânicos
OCTN – transportador de carnitina
OST – transportador de soluto orgânico
PEPT – transportador de peptídeo
P.I. – padrão interno
ppm – partes por milhão
SIM – monitoramento seletivo de íons
SLCO – família de transportadores de soluto
SNC – sistema nervoso central
 $T_{\text{máx}}$ – tempo para atingir a concentração plasmática máxima
UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography
URAT – transportador de ácido úrico
WBES – Whole-Body Exposure System

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Exposição ao tolueno	2
1.2. Polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP)	5
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivos Específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Reagentes	12
3.2. Câmara de exposição do tipo NOES	12
3.2.1. <i>Amostragem da atmosfera experimental</i>	<i>14</i>
3.2.2. <i>Análise do tolueno</i>	<i>15</i>
3.3. Protocolo experimental	15
3.3.1. <i>Grupo Controle-Pravastatina</i>	<i>16</i>
3.3.2. <i>Grupo Tolueno-Pravastatina</i>	<i>16</i>
3.4. Análise da pravastatina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas	19
3.4.1. <i>Equipamentos</i>	<i>19</i>
3.4.2. <i>Preparo das soluções padrão</i>	<i>20</i>
3.4.3. <i>Preparo das amostras</i>	<i>20</i>
3.4.4. <i>Avaliação Analítica</i>	<i>22</i>
3.4.4.1. <i>Seletividade</i>	<i>22</i>
3.4.4.2. <i>Efeito Residual</i>	<i>22</i>
3.4.4.3. <i>Efeito Matriz</i>	<i>22</i>
3.4.4.4. <i>Curva de calibração/linearidade</i>	<i>23</i>
3.4.4.5. <i>Precisão e exatidão</i>	<i>24</i>
3.4.4.6. <i>Estabilidade</i>	<i>24</i>
3.4.4.6.1. <i>Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento</i>	<i>25</i>
3.4.4.6.2. <i>Estabilidade de curta duração</i>	<i>25</i>
3.4.4.6.3. <i>Estabilidade de pós-processamento</i>	<i>25</i>
3.4.4.7. <i>Recuperação</i>	<i>25</i>
3.5. Análise farmacocinética e análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Análise da pravastatina em plasma de ratos por LC-MS	27
4.2. Influência da exposição ao tolueno por inalação na disposição cinética da pravastatina	36
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios encontrados hoje na Farmacologia Clínica é compreender a extensa variabilidade interindividual tanto na resposta terapêutica como no aparecimento de efeitos adversos. A indução ou inibição do metabolismo de fármacos, fatores ambientais, exposição ocupacional, polimorfismos genéticos, estados fisiológicos e estados patológicos são as principais causas da variabilidade na resposta farmacológica (INGEIMAN-SUNDBERG, 2001). A influência de interação fármaco-fármaco, de polimorfismos genéticos e estados fisiológicos na farmacocinética e na farmacodinâmica tem sido muito explorada na literatura científica. Entretanto, estudos que relacionam a exposição ocupacional e a variabilidade na resposta a medicamentos são raros.

O principal objetivo na toxicologia ocupacional é de preservar a saúde dos trabalhadores que estão expostos, por exemplo, à ação de agentes químicos (DELLA ROSA et al., 2014).

Agentes químicos estão presentes no ambiente de trabalho, expondo milhares de pessoas a seus efeitos. Essa exposição torna imprescindível a avaliação dos riscos à saúde do trabalhador. A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) é uma associação de higienistas, referência mundial, a qual propõe Limites de Exposição Ocupacional (LEO). Esses limites apresentam o propósito de manter a exposição a níveis considerados aceitáveis, visando garantir a proteção dos trabalhadores (ACGIH, 2010).

Durante muitos anos, a pesquisa em Farmacologia Clínica focou no metabolismo de fase I e fase II para prever a eliminação de xenobióticos. A partir do final da década de 90, a Farmacologia Clínica reconheceu que a absorção, a eliminação e a distribuição de fármacos são altamente dependentes da expressão e da atividade de proteínas transportadoras de fármacos (KALLIOKOSKI; NIEMI, 2009). Estima-se que pelo menos 5% dos genes humanos estão relacionados a transportadores, o que sugere a elevada importância das funções dessas moléculas na fisiologia, na farmacologia e na toxicologia (HEDIGER et al., 2004).

Os transportadores são responsáveis pela movimentação intracelular de fármacos em locais como fígado, rim e intestino (KNOP et al., 2015).

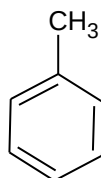
O presente trabalho buscou investigar através de um modelo experimental em ratos a influência da exposição ocupacional ao tolueno na atividade dos

transportadores da família Oatp (polipeptídeo transportador de ânions orgânicos). Para avaliar o impacto da interação entre a exposição ocupacional e a atividade do transportador Oatp foi empregado como fármaco marcador a pravastatina.

1.1. Exposição ao tolueno

O tolueno ($C_6H_5CH_3$, $M = 92,14 \text{ g mol}^{-1}$) é um hidrocarboneto aromático volátil, inflamável e transparente (Figura 1). É utilizado para aumentar a octanagem da gasolina, a qual contém de 5 a 7% de tolueno (g/g), sendo esta a maior fonte de exposição à população. Além disso, é utilizado como solvente em tintas, tintas, vernizes, detergentes, removedores, inibidores de ferrugem, corantes e colas. Também é utilizado como substituto do benzeno em diversas aplicações. No ambiente de trabalho, o tolueno está presente principalmente na forma de vapor (ACGIH, 2010). O tolueno é importante constituinte de solventes utilizados como “inalantes” por usuários de drogas de abuso.

Figura 1 – Estrutura química do tolueno.



Fonte: próprio autor

No ambiente de trabalho cerca de 40 a 60% de tolueno inalado é absorvido principalmente por inalação, sendo essa considerada a principal via de exposição (SANTOS, 2001). Em trabalhadores expostos a tolueno na concentração de 80 ppm (partes por milhão) através do ar, níveis de 2-5 $\mu\text{mol/L}$ de sangue são observados de 10-15 minutos após a exposição (HJELM et al., 1988). Os níveis de tolueno no ar alveolar correlacionam-se positivamente com os níveis de tolueno no sangue em homens e em animais. Durante exposições a tolueno 80 ppm por 4 horas, os níveis de tolueno atingem um platô de 6-7 $\mu\text{mol/L}$ em aproximadamente 2 horas (HJELM et al., 1988; LOF et al., 1990). A absorção do tolueno é significativamente aumentada quando a exposição ocorre em condições de exercícios físicos aeróbicos e/ou

musculares em indivíduos expostos (NADEAU et al., 2006). A via dérmica de exposição torna-se importante apenas quando há lesão na pele ou quando o contato da pele com o tolueno líquido é prolongado (ACGIH, 2010).

Efeitos tóxicos causados pela exposição ao tolueno estão bem descritos na literatura. O tolueno atinge principalmente o sistema nervoso central (SNC) (ATSDR, 2000). A exposição aguda em humanos ocasiona dores de cabeça, irritação nos olhos, diminuição de memória e fadiga. A precisão a estímulos visuais mostra-se reduzida quando ocorre exposição aguda a 200 ppm de tolueno (KODAVANTI et al., 2015). O uso abusivo do tolueno pode ocasionar disfunção cerebral e atrofia do hipocampo. Anomalias neuropatológicas são observadas quando o indivíduo é exposto a altos níveis do solvente (KODAVANTI et al., 2015).

A principal via de biotransformação do tolueno é a hidroxilação do grupamento metila, que é responsável pela formação do álcool benzílico através do processo que é mediado pelo sistema citocromo P450. As enzimas álcool-desidrogenase e aldeído-desidrogenase são as responsáveis pela oxidação do álcool benzílico que acarretará na formação do ácido benzóico. Quando o ácido benzoico se conjuga com a glicina ocorre a formação do ácido hipúrico. Em menor proporção ocorre também a conjugação do ácido glicurônico resultando na formação dos benzoilglicuronídeos. Através de uma via secundária de metabolização, sendo esta responsável por menos de 1% da biotransformação do tolueno absorvido, a qual é mediada por CYP, ocorre a formação de 2,3-tolueno epóxido e 3,4-tolueno epóxido, que irão originar em orto- e para-cresol (IARC, 1999; EPA, 2005).

O ácido hipúrico é o principal metabólito urinário encontrado em humanos e em ratos expostos ao tolueno. Outros metabólitos encontrados na urina são o ácido benzóico conjugado com o ácido glicurônico; o-cresol e p-cresol conjugados com sulfatos e com o ácido glicurônico; o ácido S-benzilmercaptúrico e o ácido S-p-toluilmercaptúrico. A ACGIH recomenda a determinação de tolueno no sangue, tolueno na urina ou o-cresol na urina como indicadores biológicos da exposição ao tolueno, com índices biológicos de exposição de 0,02 mg/L, 0,03 mg/L e 0,3 mg/g creatinina, respectivamente (ACGIH, 2010).

Para todos os três marcadores, os índices biológicos de exposição propostos representam sua respectiva concentração passível de ser observada em indivíduos expostos ao tolueno por inalação no limite de exposição proposto pela ACGIH de 75 mg/m³ (ou 20 ppm) como concentração média ponderada pelo tempo. No Brasil, a

Norma Regulamentadora 15 (NR 15) que estabelece as medidas sobre atividades e operações insalubres determina o limite de tolerância para uma jornada de trabalho de até 48 horas por semana de 290 mg/m^3 (ou 78 ppm) (BRASIL, 1978a). A Norma Regulamentadora 7 (NR 7) que implementou o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional recomenda a avaliação de ácido hipúrico na urina, sendo que o índice biológico máximo permitido é 2,5 g/g creatinina (BRASIL, 1978b).

A exposição ao tolueno a 125 ppm ou a 375 ppm em ratos, 6 horas/dia durante 5 dias resultou em inibição dose dependente da atividade de arilhidrocarboneto hidroxilase (AHH), CYP2B1, CYP4B1 nos pulmões, mas não do CYP1A1 (FURMAN; SILVERMAN; SCHATZ, 1998). Dados observados experimentalmente e a partir de estudos *in vitro* revelam a indução na atividade de CYP2B1/2, CYP2E1, CYP3A1 e CYP4A1 e a inibição da atividade do CYP2C11/6 após exposição a elevadas concentrações de tolueno (WANG et al., 1996) (Tabela 1). Ressaltamos que estudos que investigam a influência de solventes na disposição cinética de fármacos são escassos (Tabela 1). O trabalho desenvolvido por Mateus e colaboradores revelou ausência de alterações na disposição cinética do verapamil e norverapamil após exposição ao tolueno a 25, 50 ou 100 ppm durante 6 horas/dia, 5 dias (MATEUS et al., 2008).

Tabela 1 – Efeito da exposição ao tolueno nas enzimas do metabolismo e na disposição cinética de fármacos.

Exposição	Duração	Espécie	Observação	Referência
4000 ppm	6 h	Ratos	↑↑↑CYP2E1, CYP2B1/2 hepático ↑CYP3A1, CYP4A1 hepático ↓CYP2C11/6 hepático	WANG et al., 1996
125 ppm,	6 h/dia, 3 dias	Ratos	↓AHH, CYP2B1, CYP4B1 pulmonar	FURMAN et al., 1998
375 ppm	6 h/dia, 5 dias	Ratos	↓↓↓AHH, CYP2B1, CYP4B1 pulmonar ↔CYP1A1	FURMAN et al., 1998
10 mmol/kg	i.p., 3 dias	Ratos	↑CYP2D4 cerebral	MIZUNO et al., 2003
25 ppm, câmara NOES	6 h/dia, 5 dias	Ratos	Sem alterações na disposição cinética do verapamil e norverapamil	MATEUS et al., 2008
50 ppm, câmara NOES	6 h/dia, 5 dias	Ratos	Sem alterações na disposição cinética do verapamil e norverapamil	MATEUS et al., 2008
100 ppm, câmara NOES	6 h/dia, 5 dias	Ratos	Sem alterações na disposição cinética do verapamil e norverapamil	MATEUS et al., 2008

i.p.: administração intraperitoneal; NOES: câmara do tipo exposição apenas pelo nariz; AHH: arilhidrocarboneto hidroxilase; CYP: sistema citocromo P450; ↑: indução; ↓: inibição; ↔: sem alteração.

1.2. Polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP)

Os polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) são transportadores de captação codificados pelos genes da família de transportadores de soluto *SLCO* (anteriormente denominada *SLC21*) (HAGENBUCH; MEIER, 2004). OATPs podem ser divididos em 6 famílias: OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP5 e OATP6 e estes divididos em subfamílias como OATP1A, OATP1B e OATP1C (KOTSAMPASAKOU et al., 2015).

OATPs podem ser encontrados no fígado, rim, intestino e cérebro, exercendo função importante na disposição de fármacos, farmacocinética e toxicidade (LEE et al., 2015). Essas proteínas de membrana promovem o transporte de diversas moléculas endógenas através do organismo, incluindo sais biliares, eicosanoides, esteroides, hormônios tiroideanos e seus conjugados e também o transporte de uma série de fármacos disponíveis na clínica (HSIANG et al., 1999; CUI et al., 2001; CARDENAS-ROJAS et al., 2016). Os substratos de OATPs incluem os fármacos eritromicina, levofloxacina, pitavastatina e enalapril. A ciclosporina, telmisartana e diazepam são considerados inibidores do OATP e, portanto, potenciais interações medicamentosas na clínica podem ser relacionadas a atividade de OATPs (KOTSAMPASAKOU et al., 2015).

A elevada expressão de OATPs no fígado correlaciona-se com o seu relevante papel no transporte ativo de fármacos e xenobióticos para o meio intracelular em hepatócitos. O OATP1B1 (também chamado anteriormente de OATP-C, ou OATP2) encontra-se distribuído em todo o lobo hepático, enquanto que o OATP1B3 é encontrado principalmente nas áreas perivenosas do fígado (HSIANG, et al., 1999; HO et al., 2006; GLAESER et al., 2007; GIACOMINI et al., 2010; PENG et al., 2015). OATP1B1 é um transportador de influxo, responsável pela absorção celular de determinados compostos endógenos como, esteroides conjugados, ácidos biliares e hormônios da tireóide e também de fármacos como o metotrexato, fexofenadina e estatinas (GRAPCI et al., 2015). Os substratos de OATP1B1 (Tabela 2) incluem fármacos como as estatinas, antibióticos, inibidores de protease, antagonistas do receptor de angiotensina, inibidores da enzima conversora de angiotensina e agentes antifúngicos (VAVRICKA et al., 2002; TIRONA et al., 2003; KAMEYAMA et al., 2005; SANDHU et al., 2005; LIU et al., 2006; MAEDA et al., 2006; TREIBER et al., 2007).

Tabela 2 – Fármacos substratos de OATP1B1.

Transportador	Distribuição	Substratos
OATP1B1	Fígado	Atorvastatina, benzilpenicilina, bosentan, cerivastatina, enalapril, fluvastatina, metotrexato, olmesartana, pitavastatina, pravastatina, repaglinide, rifampicina, rosuvastatina, sinvastatina ácida, temocapril, troglitazona, valsartana

Fonte: Modificado de Niemi, 2007.

O fígado é de extrema importância na disposição de fármacos e substâncias endógenas, sendo responsável pelo metabolismo destes. Esses compostos chegam ao fígado através do sangue sinusoidal e atingem o meio intracelular por difusão passiva e/ou absorção ativa mediada por proteínas de transporte presentes na membrana basolateral. O destino desses compostos no interior dos hepatócitos é dependente de células que regulam as concentrações dos compostos presentes no meio celular. As proteínas de transporte são as responsáveis pela disposição hepatocelular dessas substâncias que necessitam de um mecanismo de efluxo para deixar os hepatócitos de forma eficiente (PFEIFER; HARDWICK; BROUWER, 2014).

O efluxo hepatocelular quando inibido terá sua função hepática afetada, interferindo na excreção de substâncias endógenas, como a bilirrubina e ácidos biliares e também a disposição cinética de fármacos (PFEIFER; HARDWICK; BROUWER, 2014).

OATP1B1 é o transportador de captação encontrado em maior abundância nos hepatócitos seguido de OATP1B3 e OATP2B1 (BADÉE et al., 2015).

Interações medicamentosas, polimorfismos genéticos e a depuração hepática de muitos fármacos, podem ocasionar modificações nos transportadores OATP1B1 e OATP1B3. Essas alterações podem ocasionar reações adversas (MAEDA, 2015).

O OATP1B1 transporta ativamente fármacos do sangue para o fígado (Figura 2), resultando em aumento da exposição às enzimas que biotransformam os fármacos. Para os substratos de OATPs, o transporte bidirecional através das membranas celulares por difusão passiva associado ao transporte ativo irão definir a sua disposição cinética no fígado. O transporte ativo pode ser ainda a primeira etapa

da excreção ativa de fármacos na bile. As estatinas, por exemplo, são ativamente transportadas para o fígado, seu órgão alvo, reduzindo a sua exposição sistêmica (PARK et al., 2008). Por outro lado, a competição entre duas moléculas pelos OATPs pode aumentar drasticamente a exposição sistêmica de um deles, aumentando o risco do aparecimento de efeitos adversos sistêmicos (BACKMAN et al., 2002; SMITH; FIGG; SPARREBOOM, 2005; NIEMI, 2007; van GIERBERGEN et al., 2007).

Os potenciais fármacos marcadores da atividade *in vivo* de OATP1B1 incluem diversos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, entre eles a sinvastatina (ácida), pitavastatina, atorvastatina, pravastatina e rosuvastatina (NIEMI; PASANEN; NEUVONEN, 2011; PRADO et al., 2015). A pravastatina apresenta baixa biodisponibilidade resultante de baixa absorção intestinal e de elevada eliminação pré-sistêmica. Trata-se um fármaco de baixa lipofilicidade e que não é significativamente metabolizado pelas enzimas do sistema citocromo P450 (CYP), embora CYP3A4 e outras isoformas contribuam pela eliminação de uma pequena fração da dose, com a formação de metabólitos hidroxilados (JACOBSEN et al., 1999; HATANAKA, 2000).

Os principais metabólitos da pravastatina encontrados na urina, plasma e fezes são a 3' α -isopravastatina e a 6'-epipravastatina formados a partir de isomerização não enzimática no estômago e a 3''-hidroxipravastatina formada por oxidação mediada por CYP3A (EVERETT et al., 1991, Figura 3). A área sob a curva (ASC) da 3' α -isopravastatina corresponde a cerca de 35% da ASC da pravastatina. Por outro lado, a oxidação mediada por CYP3A não representa uma via importante de eliminação, em função do baixo clearance intrínseco da pravastatina por essa via (JACOBSEN et al., 1999; HATANAKA, 2000).

O transporte de pravastatina para as células hepáticas é altamente dependente da sua captação pelo OATP1B1 (HSIANG et al., 1999) e determinante para a eliminação através de excreção biliar. O papel do transporte ativo hepatocelular da pravastatina via OATP1B1 foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* usando inibidores (NAKAGOMI-HAGIHARA et al., 2007; BADOLO et al., 2013). Entretanto, da mesma forma que outros substratos de OATP1B1, diversas estatinas são também substratos de outros OATPs hepáticos. A pravastatina e a atorvastatina são substratos de OATP2B1 (KOBAYASHI et al., 2003; GRUBE et al., 2006); a fluvastatina e a rosuvastatina são substratos de OATP1B3 e OATP2B1 (NIEMI;

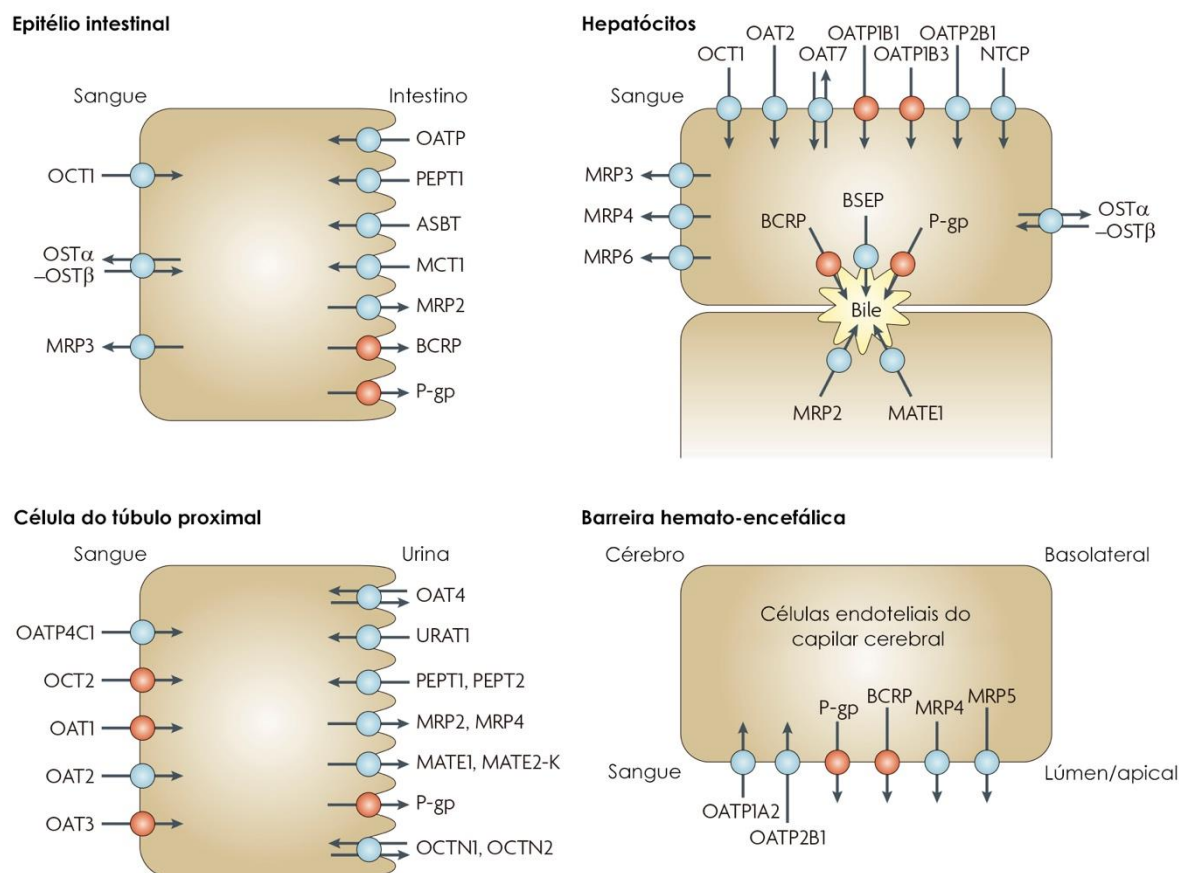
PASANEN; NEUVONEN, 2011); e a pitavastatina é substrato de OATP1B3 (NIEMI; PASANEN; NEUVONEN, 2011).

Estudos populacionais revelam que a biodisponibilidade relativa da pravastatina é significativamente aumentada em 1,5-1,95 vezes nos indivíduos heterozigotos e homozigotos do *SLCO1B1*15* se comparados aos indivíduos não portadores deste polimorfismo (IDE et al., 2009).

A identificação e caracterização dos transportadores de efluxo e influxo estão bem descritas na literatura em relação à sua expressão e localização nos tecidos. No entanto, estudos sobre as potenciais interações e fatores que influenciam na atividade de transportadores são pouco explorados. Estudos farmacocinéticos são importantes para garantir a segurança e eficácia na utilização de fármacos através de uma melhor compreensão do efluxo hepático (PFEIFER; HARDWICK; BROUWER, 2014).

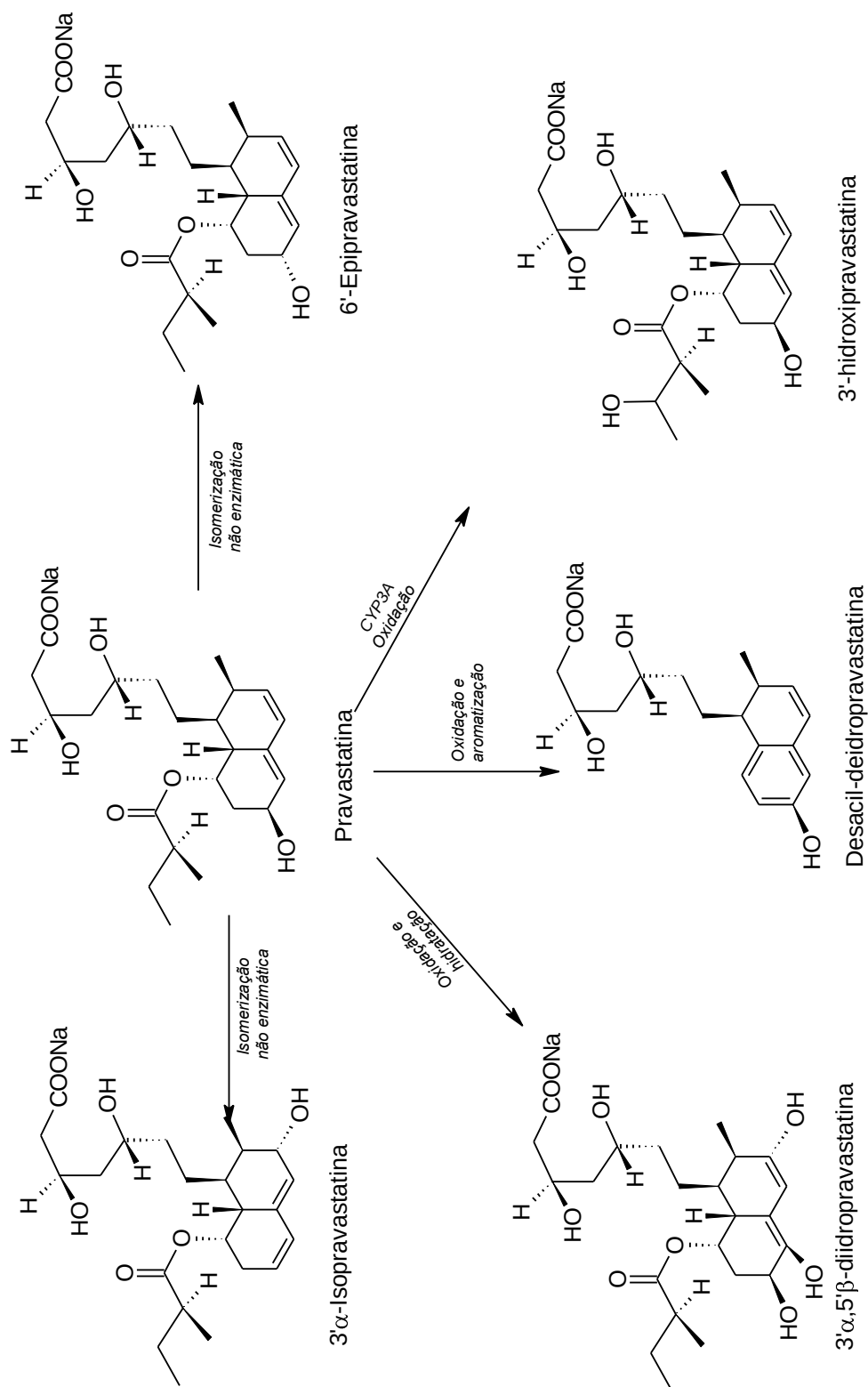
A influência da exposição ao tolueno na atividade de OATPs não foi descrita até o momento na literatura. A investigação da influência dessa exposição na atividade do transportador OATP1B1, encontrado abundantemente nos hepatócitos, poderá contribuir na identificação de covariáveis da atividade do transportador e avaliar a necessidade de ajustes de dose visando garantir a segurança e eficácia de fármacos substratos do transportador.

No presente estudo, a pravastatina foi utilizada como marcador da atividade de OATP1B1 visto que sua entrada nos hepatócitos é altamente dependente da captação realizada por esse transportador (HSIANG et al., 1999). Considerando que os transportadores OATP1B1 e OATB1B3 humanos apresentam como único ortólogo em roedores o *Oatp1b2* (Roth et al., 2012), para fins de nomenclatura nesta dissertação, a pravastatina será descrita como fármaco marcador da atividade de transportadores da família *Oatp* em ratos.

Figura 2 – Localização do transportador de ânions orgânicos 1B1 (OATP1B1).

Fonte: modificado de GIACOMINI et al. (2010). ASBT: transportador apical de sais biliares dependente de sódio; BCRP: proteína de resistência ao câncer de mama; BSEP: bomba exportadora de sais biliares; MATE1 e MATE2-K: proteína de extrusão de fármacos e toxinas; MCT1: transportador de ácido monocarboxílico; MRP2, 3, 4, 5 e 6: proteína de resistência a múltiplos fármacos; NTCP: polipeptídeo co-transportador taurocolato de sódio; OAT1, 2, 3, 4, 7: transportador de ânions orgânicos; OATP: polipeptídeo transportador de ânions orgânicos; OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 e OATP4C1: polipeptídeo transportador de ânions orgânicos 1A2, 1B1, 1B3, 2B1 e 4C1; OCT1 e 2: transportador de cátions orgânicos 1 e 2; OCTN1 e 2: transportador de carnitina 1 e 2; OST α e OST β : transportador de soluto orgânico alfa e beta; PEPT1 e 2: transportador de peptídeo 1 e 2; P-gp: glicoproteína P; URAT1: transportador de ácido úrico 1.

Figura 3 – Principais vias de biotransformação da pravastatina.



Fonte: próprio autor (modificado de HATANAKA, 2000).

2. OBJETIVOS

A presente investigação teve por objetivo avaliar a influência da exposição ao tolueno por inalação na atividade *in vivo* dos transportadores da família Oatp em ratos através do biomarcador pravastatina.

2.1. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos incluem:

- Desenvolver e validar método de determinação da pravastatina em plasma de rato por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas;
- Avaliar a influência da exposição ao tolueno na atividade *in vivo* dos transportadores da família Oatp empregando a pravastatina como fármaco marcador;
- Monitoramento da concentração do tolueno no ambiente de exposição por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os padrões pravastatina sódica e fluvastatina, ambos com pureza $\geq 98\%$, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes acetonitrila (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA), éter metil-terc-butílico (Panreac, Darmstadt, Germany) são grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) e os reagentes ácido acético (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido fórmico 1% (Synth, Diadema, Brasil) são grau analítico. O tolueno 99,9% foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), dissulfeto de carbono (Riedel-de Haen, Seelze, Germany) e isopropilbenzeno (Merck, Hohenbrunn, Munchen). Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q[®] Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

3.2. Câmara de exposição do tipo NOES

Os animais foram expostos ao tolueno na concentração de 85 mg/m^3 em uma câmara tipo NOES (*Nose Only Exposure System*) que se encontra no biotério da disciplina de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, e é composta por 44 portas de exposição. Duas das portas foram utilizadas para a amostragem da atmosfera experimental e as demais foram utilizadas para exposição simultânea de até quarenta e dois animais (Figura 4). A câmara de exposição foi construída na Oficina de Precisão da Universidade de São Paulo, Câmpus de Ribeirão Preto - USP.

A atmosfera experimental (Figura 5) é gerada em fluxo contínuo de ar comprimido que é dividido em duas partes, sendo a primeira direcionada a um borbulhador com água destilada para restauração da umidade e a segunda combinada com um fluxo controlado do solvente, através da utilização de uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) responsável pelo bombeamento contínuo do solvente usando uma seringa “*gas-tight*”. As duas correntes de ar são posteriormente combinadas e turbilhonadas por estreitamento do tubo até alcançarem a câmara de exposição.

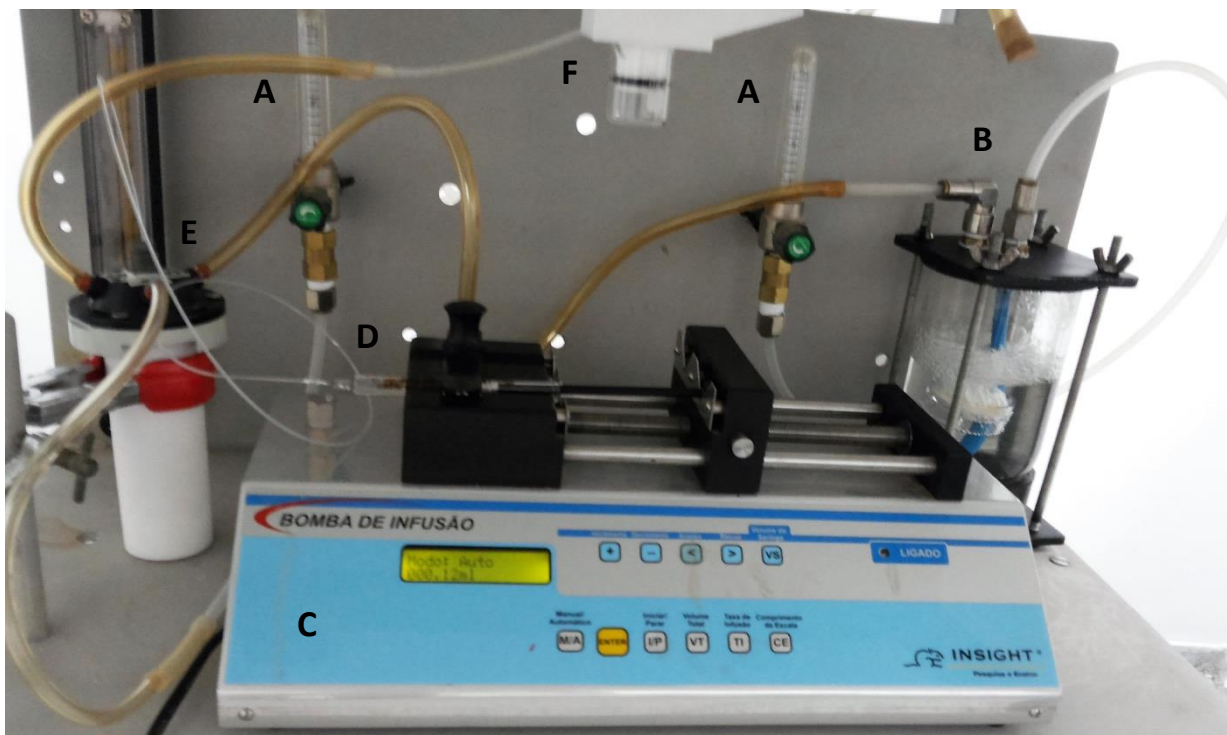
Os animais são mantidos em contentores de acrílico que são acoplados nas portas da câmara de exposição, onde irão inalar o solvente.

Figura 4 – Câmara para exposição simultânea de até 42 animais apenas pelo nariz (tipo *NOES*), com contentores acoplados.



Fonte: foto cedida pelo Prof. José Salvador Lepera da FCF-UNESP.

Figura 5 – Sistema de Infusão do solvente na câmara de exposição do tipo NOES. A) Entrada de ar comprimido. B) Borbulhador responsável por umidificar o ar. C) Bomba de infusão. D) Seringa “gas-tight”. E) Sistema gerador de atmosfera. F) Entrada na câmara de exposição.



Fonte: próprio autor

3.2.1. Amostragem da atmosfera experimental

Amostras da atmosfera experimental foram coletadas durante 15 minutos na primeira, terceira e sexta horas de funcionamento da câmara. As amostras foram coletadas em tubos adsorventes de carvão 100/50 mg (SKC[®], Eighty Four, PA, EUA) posicionados em quatro portas (duas na parte superior da câmara e duas na parte inferior da mesma) diametralmente opostas, utilizando bombas de amostragem com controle de fluxo microprocessado (SKC[®] Inc, Eighty Four, PA, EUA). Rolhas perfuradas no centro foram utilizadas para encaixar os tubos de coleta e simular a exposição dos animais apenas pelo nariz. Foram verificadas as flutuações de concentração da atmosfera experimental entre as portas de exposição (homogeneidade) e ao longo do tempo, durante um ciclo de exposição de seis horas (estabilidade). Para garantir a estabilidade durante todo o período da exposição (4 semanas) amostras da atmosfera experimental foram coletadas semanalmente, na terceira hora do terceiro dia útil da semana para a realização dos testes de

estabilidade de longa duração. As amostras coletadas foram mantidas a -20° C até o momento da análise.

3.2.2. *Análise do tolueno*

O tolueno na atmosfera experimental foi analisado por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia descrita por Lepera e Colacioppo (2005). A análise do tolueno foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Para a análise do tolueno foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Perkin Elmer modelo Clarus 680, Shelton, EUA) com detecção por ionização de chama e uma coluna capilar (Elite 624, Perkin Elmer Shelton, EUA), medindo 30 m × 250 µm, recoberta por filme de espessura 1,4 µm. O volume da injeção foi de 1 µL. O detector foi mantido a temperatura de 200° C e a temperatura do injetor a 180° C. Utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. Foi utilizado controle de divisão Split (1:10) no fluxo de 10 mL/min.

Em resumo, para o preparo dos padrões foi utilizado dissulfeto de carbono contendo o padrão interno (P.I.) isopropilbenzeno, na proporção de 3 µL. Os padrões foram preparados nas concentrações de 54 µg/mL, 108 µg/mL, 216 µg/mL, 432 µg/mL e 864 µg/mL.

Para realizar a análise das amostras, todo o conteúdo do tubo adsorvente contendo carvão ativado foi transferido para *vial* de vidro de 5 mL e 2 mL de solução de dissulfeto de carbono contendo o padrão interno (isopropilbenzeno) foram adicionados. Após repouso de 30 minutos 1 mL da solução foi transferido para tubo recravável e então submetido a análise em cromatógrafo gasoso. O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras.

3.3. **Protocolo experimental**

O presente protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Parecer nº 38/2014). Foram utilizados ratos machos *Wistar*, com peso de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista. Coletas de no máximo 3 amostras por animal (DIEHL et al., 2001)

foram realizadas em diferentes tempos com o intuito de utilizar o menor número possível de animais para a realização do experimento. Os animais permaneceram durante três dias no Biotério do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP para adaptação com livre acesso a água e ração, em sala com controle de temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e umidade $60 \pm 20\%$. Os animais foram divididos em dois grupos, conforme o seguinte protocolo:

3.3.1. Grupo Controle-Pravastatina

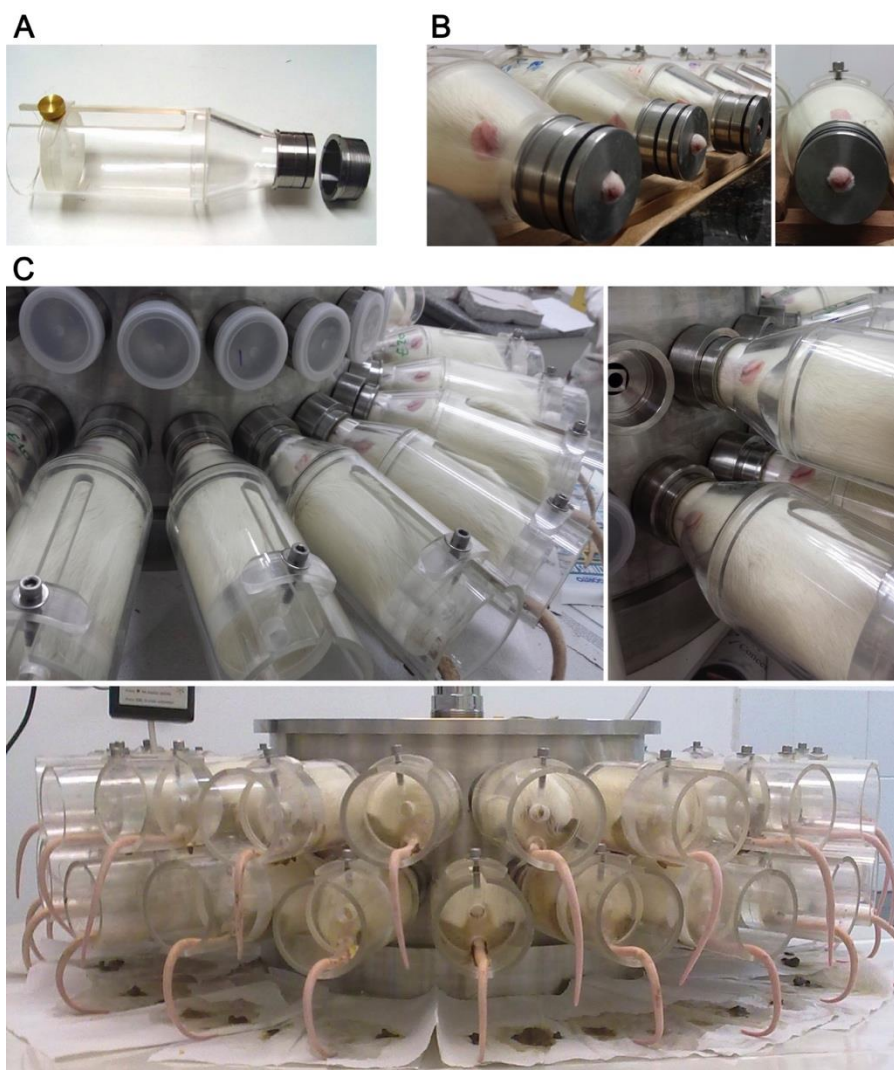
Os animais do grupo Controle ($n=6$, por tempo de coleta) foram mantidos em contentores (Figura 6A) e expostos ao ar na câmara de exposição por 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas, como mostram as Figuras 6B e 6C. Após 4 semanas, os animais, em jejum de 12 horas, receberam através da administração por via oral (gavagem), o fármaco pravastatina dissolvido em salina estéril na dose de 20 mg/kg (KIVISTÖ et al., 2005; BADOLO et al., 2013; TAYEL et al., 2015), posteriormente foram colocados na câmara de exposição e, mantidos durante 6 horas. Foram realizadas coletas de sangue nos tempos 0, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h (TAYEL et al., 2015) após a administração da pravastatina. Amostras de sangue (750 μL) foram coletadas em seringas heparinizadas (Liquemine[®] 5000 UI, Roche), sendo que apenas três amostras em diferentes tempos ($n=6$, para cada tempo) foram coletadas de cada animal através de incisão da cauda após vasodilatação por aquecimento localizado a 42°C . Os plasmas foram obtidos após a centrifugação e armazenados a -80°C até o momento da análise.

3.3.2. Grupo Tolueno-Pravastatina

Os animais do grupo Tolueno-Pravastatina ($n=6$, por tempo de coleta) foram expostos ao tolueno na câmara de exposição em concentrações superiores a 1 LEO (limite de exposição ocupacional) (85 mg/m^3) durante 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas. Após 4 semanas, os animais, em jejum de 12 horas, receberam através da administração por via oral (gavagem), o fármaco pravastatina dissolvido em salina estéril na dose de 20 mg/kg (KIVISTÖ et al., 2005; BADOLO et al., 2013; TAYEL et al., 2015), posteriormente foram colocados na câmara de

exposição e, mantidos durante 6 horas. Foram realizadas coletas de sangue nos tempos 0, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8 h após a administração do fármaco. As amostras de sangue (750 µL) foram coletadas em tubos heparinizados (Liquemine® 5000 UI, Roche), sendo que apenas três amostras em diferentes tempos (n=6, para cada tempo) foram coletadas de cada animal através de incisão da cauda após vasodilatação por aquecimento localizado a 42° C. Os plasmas foram obtidos após a centrifugação e armazenados a -80° C até o momento da análise.

Figura 6 – Preparo dos animais para o protocolo experimental. A) Contentor cilíndrico de acrílico com a ponta em aço inox e tampa posterior deslizante que permite ajuste de acordo com o tamanho do animal. B) Animais em contentores com ponta em aço inox, com furo central para exposição apenas pelo nariz. C) Animais em contentores na câmara de exposição do tipo NOES com capacidade para expor até 42 animais simultaneamente.



Fonte: A: foto cedida pelo Prof. José Salvador Lepera da FCF-UNESP; B e C: próprio autor.

3.4. Análise da pravastatina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas

3.4.1. Equipamentos

A determinação da pravastatina no plasma foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS), utilizando um cromatógrafo Perkin Elmer (Shelton, EUA), composto de um sistema binário de bombas (Flexar LC Pump), degaseificador (Flexar solvent manager), forno (Flexar LC column oven), injetor automático (Flexar LC Autosampler) e detecção por espectrometria de massas (Perkin Elmer, Flexar SQ 300 MS).

A pravastatina e o padrão interno fluvastatina foram resolvidos em uma coluna de fase reversa Purospher® STAR RP-18 capeada (125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 22° C e fase móvel constituída por acetonitrila:água acidificada com 0,1% de ácido acético (LI et al., 2014) na proporção (55:45, v/v) e vazão de 0,5 mL/min, em modo isocrático.

O efluente da coluna cromatográfica foi dirigido para o espectrômetro de massas (MS) quadrupolo simples Flexar SQ 300 MS Perkin Elmer (Shelton, EUA), na vazão de 0,5 mL/min. A análise por espectrometria de massas foi realizada no modo electrospray negativo. A voltagem do capilar na ionização por electrospray foi de 6,0 kV. A temperatura de dessolvatação foi mantida a 350° C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 12 L/min. A voltagem do cone utilizada foi calibrada com relação ao autotune para a pravastatina e para o padrão interno.

As condições de otimização do MS foram obtidas através de infusão direta da solução padrão de pravastatina (500 ng/mL) preparada na fase móvel e introduzida com bomba de infusão na vazão de 10 µL/min. A análise para otimização da voltagem do CAPEX foi executada através da variação da voltagem pelo tempo (-350 V a -50 V com variação de 2 V) e pela observação dos íons de razão massa carga (m/z) 423 para pravastatina e de seu fragmento m/z 321 (JAIN et al., 2007; WANG; WANG, 2008; SPARIDANS et al., 2010; AQUILANTE et al., 2012; BADOLO et al., 2013) resultando em um valor ótimo de -90 V. O íon molecular desprotonado [M-H]⁻ de razão m/z 423 foi utilizado para monitorização da pravastatina e o íon molecular desprotonado [M-H]⁻ de razão m/z 410 para o padrão interno fluvastatina.

A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa Chromera, versão 3.4.0.5712 (Perkin Elmer, Shelton, EUA).

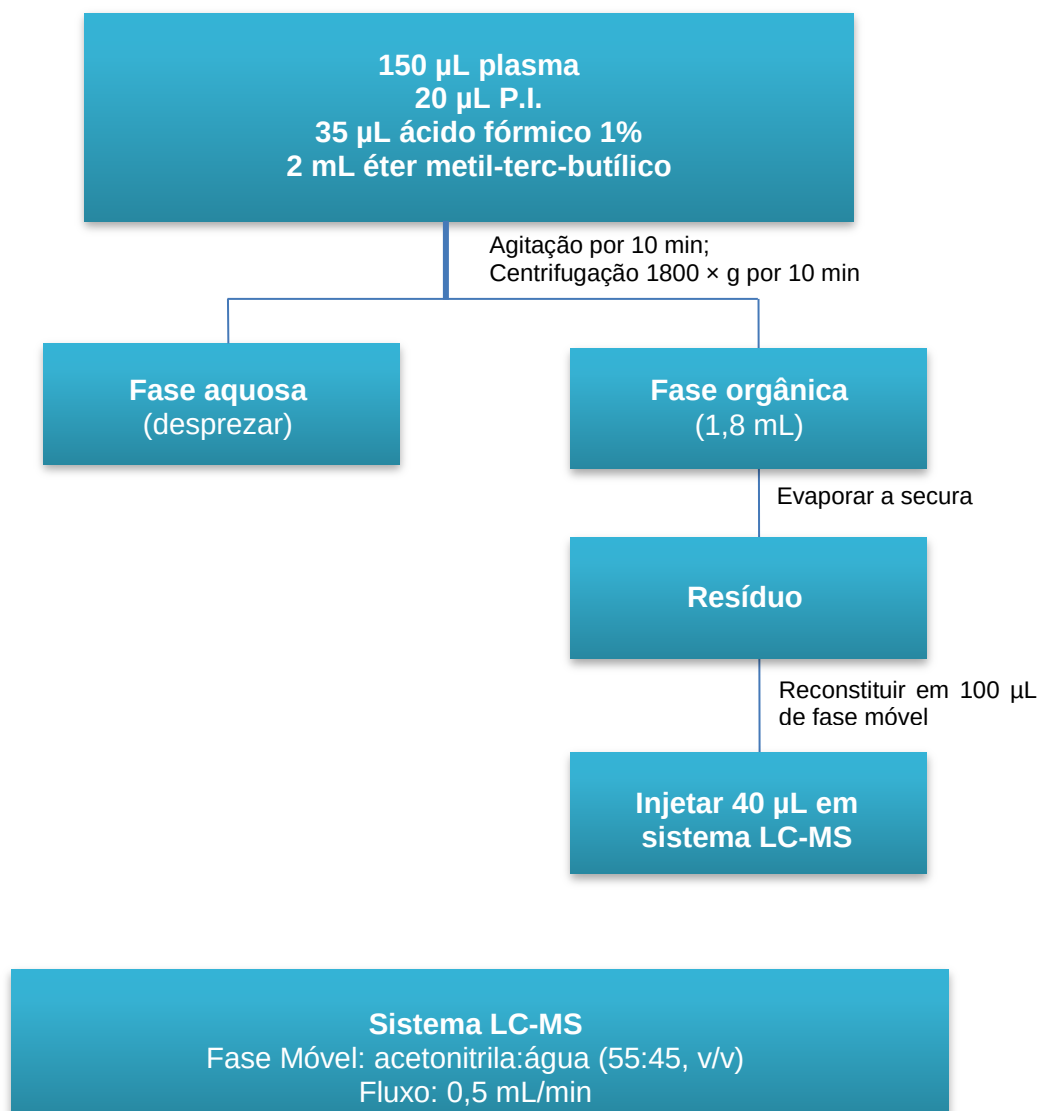
3.4.2. *Preparo das soluções padrão*

A solução padrão estoque pravastatina foi preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol, a partir da qual uma solução intermediária de 100 µg/mL foi obtida e através de diluições os padrões de calibração foram obtidos nas seguintes concentrações 0,15 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,6 µg/mL, 1,5 µg/mL, 3 µg/mL e 6 µg/mL. A partir da solução de 3 µg/mL os padrões de 0,006 µg/mL, 0,015 µg/mL e 0,03 µg/mL foram preparados. O padrão interno fluvastatina foi preparado na concentração de 400 ng/mL e todas as soluções foram preparadas em metanol. Todas as soluções foram armazenadas a -20° C.

3.4.3. *Preparo das amostras*

Alíquotas de 150 µL de plasma foram enriquecidas com 20 µL da solução contendo padrão interno (fluvastatina 400 ng/mL), 35 µL da solução de ácido fórmico 1% e 2 mL do solvente extrator éter metil-terc-butílico. As amostras foram agitadas durante 10 minutos em mesa agitadora recíprocante (TE-240 Tecnal, 130 ± 10 ciclos/min), centrifugadas por 10 minutos a 1800 × g. A fase orgânica (1,8 mL) de cada amostra foi transferida para microtubos de 2 mL e evaporada à secura sob fluxo de nitrogênio em sistema de aquecimento seco a 40° C (Techne, dri block DB 200/3, Stone, Reino Unido). O resíduo foi reconstituído em 100 µL da fase móvel, agitados por 30 segundos e 40 µL foram injetados na coluna cromatográfica (Figura 7).

Figura 7 – Procedimento de extração líquido-líquido da pravastatina em plasma de rato.



P.I.: padrão interno; LC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas.

3.4.4. Avaliação Analítica

O método desenvolvido para análise da pravastatina em plasma de rato foi validado tomando como base as recomendações da ANVISA para a validação de métodos bioanalíticos (Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012; BRASIL, 2012). Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade da pravastatina em plasma em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento.

3.4.4.1. Seletividade

Amostras de plasma branco obtidas de 6 fontes distintas, sendo 4 normais e 2 hemolisadas, foram utilizadas para avaliar a seletividade da metodologia. Para que um método seja considerado seletivo, respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito e respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno (P.I.) inferiores a 5% da resposta do P.I. quando amostras branco são comparadas as amostras do limite inferior de quantificação (LIQ).

Considerando as condições controladas de alimentação em todos os animais investigados, sendo a mesma alimentação fornecida para todos os animais, não foram utilizadas amostras lipêmicas para avaliar a seletividade e efeito matriz.

3.4.4.2. Efeito Residual

O efeito residual é avaliado através de três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada do limite superior de quantificação (LSQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do P.I. inferiores a 5% quando comparados à amostra processada do LIQ.

3.4.4.3. Efeito Matriz

O efeito matriz é avaliado comparando as áreas dos picos da pravastatina e do padrão interno fluvastatina em solução com as áreas dos picos resultantes do

plasma processado conforme protocolo de preparo de amostra e posteriormente enriquecido com o analito e o padrão interno. Para avaliação do efeito matriz foram utilizados plasmas de 8 fontes distintas, sendo 6 amostras normais e 2 amostras hemolisadas. As amostras analisadas devem apresentar as mesmas concentrações dos controles de qualidade de baixa concentração (CQB, 5 ng/mL) e do controle de qualidade de alta concentração (CQA, 1500 ng/mL).

A Equação 1 foi utilizada para obter o fator matriz normalizado por P.I. (FMN) para cada amostra:

$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}} \quad (1)$$

A ausência de efeito matriz é definida pelo coeficiente de variação (CV %) dos FMN relativos a todas as amostras inferior a 15%.

3.4.4.4. Curva de calibração/linearidade

Para a construção da curva de calibração, alíquotas de 150 µL de plasma branco enriquecidas com 50 µL da solução padrão, foram utilizadas. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito anteriormente (itens 3.4.3 e 3.4.1). A triplicata da curva de calibração foi construída a partir de amostras preparadas nas concentrações finais de 2; 5; 10; 50; 100; 200; 500; 1000 e 2000 ng/mL de pravastatina em plasma. Para a aceitação da curva de calibração foram utilizados os critérios definidos pela Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). A regressão linear ordinária entre a razão de áreas pravastatina/padrão interno versus concentração, no intervalo de concentrações de 2 a 2000 ng/mL, foi utilizada. Valores de % erro versus concentração superiores a 15% foram observadas, sendo, portanto necessária a utilização de um método que diminuísse a influência que cada ponto exerce sobre a curva de calibração, devido a grande variação entre as concentrações.

A linearidade do método foi dada através da utilização da transformação log-log dos valores de x (concentração) e y (razão de áreas padrão/padrão interno) antes da regressão linear ordinária (SINGTOROJ et al., 2006).

3.4.4.5. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão devem ser determinadas em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas diferentes (intercorrídas). Os controles de qualidade limite inferior de quantificação (LIQ = 2 ng/mL), controle de qualidade de baixa concentração (CQB = 5 ng/mL), controle de qualidade de média concentração (CQM = 500 ng/mL), controle de qualidade de alta concentração (CQA = 1500 ng/mL) e controle de qualidade de diluição (CQD = 5000 ng/mL) foram analisados em quintuplicatas. A precisão intracorrída e intercorrída é adequada quando o coeficiente de variação (CV) não for superior a 15%, exceto para a menor concentração, para a qual é aceitável o CV de até 20%. O CV é determinado conforme a Equação 2.

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (2)$$

A exatidão intracorrída e intercorrída é determinada através do cálculo do erro padrão relativo (EPR) o qual deve apresentar valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores inferiores a $\pm 20\%$ do valor nominal. O EPR é calculado conforme a Equação 3.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{\text{Valor nominal}} \quad (3)$$

3.4.4.6. Estabilidade

A estabilidade da pravastatina foi analisada usando amostras de CQB (5 ng/mL) e CQA (1500 ng/mL) analisadas em triplicada. A concentração das amostras foi determinada por curva de calibração recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentar desvio superior a 15%. A estabilidade do analito na matriz biológica foi demonstrada por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento. Ainda serão realizados estudos complementares para avaliação da estabilidade da pravastatina em solução e estudos de estabilidade de longa duração.

3.4.4.6.1. *Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento*

Amostras CQB e CQA foram utilizadas para avaliar a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras foram congeladas à -20° C e mantidas por 24 horas. Na sequência, as amostras foram descongeladas até atingirem temperatura ambiente. Após atingirem a temperatura ambiente, as mesmas foram congeladas novamente sob as mesmas condições anteriores. Esse procedimento foi repetido por três ciclos e após o último ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram analisadas por LC-MS.

3.4.4.6.2. *Estabilidade de curta duração*

No estudo de estabilidade de curta duração das amostras, as mesmas foram processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente por tempo superior ao utilizado durante o estudo. Para este estudo as amostras permaneceram por 6 horas em temperatura ambiente (23 ± 2° C) e então foram processadas e analisadas.

3.4.4.6.3. *Estabilidade de pós-processamento*

As amostras dos controles de qualidade de baixa e alta concentração foram submetidas às mesmas condições de análises utilizadas no estudo, porém por um período superior à duração da corrida analítica. Neste estudo, antes de realizar a análise, as amostras processadas foram mantidas dentro do autoinjeter por um período de 12 horas à temperatura de 12° C.

3.4.4.7. *Recuperação*

Áreas de padrões não extraídos foram comparados com soluções padrão em matriz na mesma concentração para determinar a eficiência do procedimento de extração, através da equação 4.

$$R\% = \frac{\text{Padrão extraído}}{\text{Padrão não extraído}} \times 100 \quad (4)$$

3.5. Análise farmacocinética e análise estatística

As áreas sob as curvas concentração plasmática *versus* tempo ($ASC^{0-\infty}$) foram calculadas através da Quadratura de Gauss-Laguerre. As concentrações referentes aos tempos não coincidentes aos nós da quadratura foram estimadas por interpolação polinomial (AMISAKI, 2001). O clearance total aparente ($\frac{CL_T}{F}$) foi calculado a partir da Equação 5.

$$\frac{CL_T}{F} = \frac{Dose}{ASC^{0-\infty}} \quad (5)$$

Os parâmetros farmacocinéticos $ASC^{0-\infty}$ foram comparados entre os grupos exposto e não exposto (controle) ao tolueno através dos intervalos de confiança 95% para a diferença entre os valores de $ASC^{0-\infty}$. As variâncias foram estimadas considerando que as amostras podem ser colhidas de um mesmo animal, mas não em todos os tempos de coleta, sendo considerada uma amostragem esparsa de acordo com Capela e colaboradores (2012). Os cálculos para a análise estatística foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Jorge Manuel Vieira Capela do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da pravastatina em plasma de ratos por LC-MS

Diversos métodos cromatográficos para análise de pravastatina em fluidos biológicos já foram descritos, sendo a maioria deles usando a detecção por ultravioleta (IACONA et al., 1994; NABA et al., 2004; BAUER et al., 2005; HASEGAWA et al., 2010) e por espectrometria de massas (LI et al., 2014). No presente estudo, foi desenvolvido um método de análise da pravastatina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria massas, visto que esta é uma técnica que oferece elevada detectabilidade em relação a detecção por ultravioleta (TSAI; TSAI, 2005).

Foi utilizada a coluna em fase reversa Purospher® STAR RP-18 capeada (5 µm, 125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) e fase móvel constituída por acetonitrila:água acidificada com 0,1% de ácido acético na proporção (55:45, v/v) e vazão de 0,5 mL/min. A fluvastatina, fármaco pertencente a mesma classe terapêutica da pravastatina, foi utilizada como padrão interno em função da sua similaridade estrutural com o analito de interesse. A utilização do padrão interno em análises quantitativas minimiza erros que possam ocorrer durante o processo de preparo e injeção das amostras no sistema HPLC (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

As amostras foram preparadas por extração líquido-líquido usando o solvente éter metil-terc-butílico. A recuperação do processo de extração usando o éter metil-terc-butílico teve valor médio de 86%. Outros trabalhos cujo preparo de amostra se deu por extração líquido-líquido usaram os solventes acetato de etila (NABA et al., 2004), éter dietílico/propanol (KIVISTÖ et al., 2005), éter terc-metil-butílico (POLAGANI; PILLI; GANDU, 2012) e n-butanol (LI et al., 2014), éter dietílico/diclorometano (TAYEL et al., 2015). Os solventes citados anteriormente foram testados, porém todos mostraram recuperação inferior ao solvente utilizado.

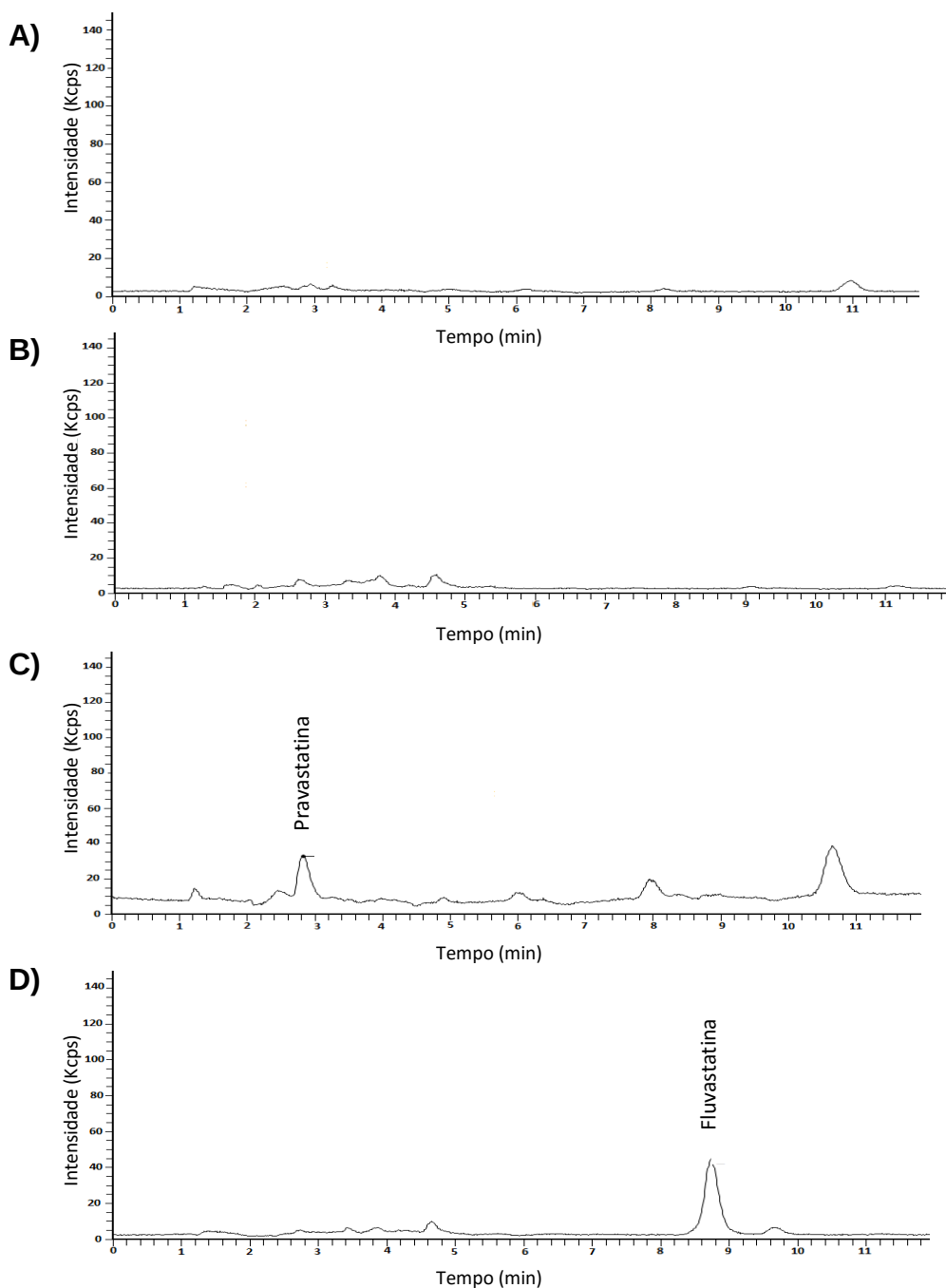
O uso da fase móvel acetonitrila:água na proporção 55:45, v/v acidificada com 0,1% de ácido acético na vazão de 0,5 mL/min resultou na observação do tempo de retenção de 2,9 min para pravastatina e 8,9 min para o padrão interno. A análise cromatográfica apresentou adequada resolução entre os analitos e um tempo de análise relativamente curto o que é essencial para estudos farmacocinéticos devido

a grande quantidade de amostras a serem analisadas. Foi utilizada a coluna de fase reversa Purospher® STAR RP-18 capeada. Diversos métodos descritos na literatura também utilizaram coluna cromatográfica de fase reversa C18 para a análise de pravastatina em plasma (IACONA et al., 1994; OTTER; MIGNAT, 1998; BAUER et al., 2005; TSAI; TSAI, 2005; DENG et al., 2008; SPARIDANS et al., 2010; IUSUF et al., 2012; POLAGANI; PILLI; GANDU, 2012; LI et al., 2014; TAYEL et al., 2015).

O método foi validado tomando como base as recomendações da Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade. A validação do método desenvolvido foi realizada em função da sua aplicação em estudos de farmacocinética da pravastatina em ratos tratados com dose única de 20 mg/kg.

Os testes para avaliação da seletividade foram realizados usando amostras de plasma obtidas de 6 fontes distintas, sendo 4 normais e 2 hemolisadas. O método foi considerado seletivo, pois no tempo de retenção da pravastatina e do padrão interno não foram encontrados picos interferentes com área superior a 20% e 5% respectivamente quando comparados ao LIQ. Os cromatogramas mostram a separação entre o analito e o padrão interno, assim como a eluição dos compostos sem a interferência de substâncias do plasma como mostra a Figura 8.

Figura 8 – Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS. Os cromatogramas (A) e (B) referem-se à análise de plasma branco. Os cromatogramas (C) e (D) referem-se à análise de amostra de plasma enriquecida com pravastatina no limite inferior de quantificação (LIQ) e padrão interno. A razão m/z de 423 foi monitorada para a pravastatina nos cromatogramas (A) e (C) e a razão m/z de 410 foi monitorada para o padrão interno fluvastatina nos cromatogramas (B) e (D).



Condições cromatográficas: coluna de fase reversa Purospher® STAR RP-18 capeada (125×4 mm, Merck, Darmstadt, Alemanha) com tamanho de partícula de 5 μ m, mantida a 22° C e fase móvel constituída por acetonitrila:água acidificada com 0,1% de ácido acético na proporção (55:45, v/v) e vazão de 0,5 mL/min.

Para a avaliação do efeito residual foram realizadas injeções de uma mesma amostra branco, sendo uma antes da amostra processada no LSQ e duas logo após o mesmo. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos de amostras processadas do LIQ e não foi observado efeito residual nos tempos de retenção da pravastatina e do padrão interno.

No presente estudo, o efeito matriz foi considerado ausente para a análise da pravastatina em plasma de ratos por LC-MS. As amostras processadas do CQB e do CQA preparadas usando oito fontes diferentes de plasma, sendo 6 normais e 2 hemolisadas, foram analisadas e comparadas com soluções preparadas nas mesmas concentrações. O fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) foi calculado para cada amostra e o coeficiente de variação dos FMNs obtido mostrou-se inferior a 15% (Tabela 3). O efeito matriz pode levar a erros importantes nas análises quantitativas e não foi avaliado em todos os métodos para análise da pravastatina em plasma por LC-MS publicados previamente (KAWABATA; MATSUSHIMA; SASAHARA, 1998; DENG et al., 2008; SPARIDANS et al., 2010; AQUILANTE et al., 2012; LI et al., 2014).

Tabela 3 – Efeito matriz na análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS.

Concentração	CQB (5 ng/mL)	CQA (1500 ng/mL)
CV (%)	10,0	9,0

CV = coeficiente de variação $[(\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

No presente estudo, foram utilizadas alíquotas de apenas 150 μL de plasma para a análise de pravastatina por LC-MS. O mesmo volume de amostra foi utilizado por Tayel et al. (2015) na análise da pravastatina em plasma por UHPLC-MS/MS, técnica altamente sensível e específica, mas disponível ainda em poucos laboratórios de pesquisa.

O presente método foi linear no intervalo de concentrações de 2 a 2000 ng de pravastatina/mL de plasma. A faixa de concentração estabelecida foi selecionada com base em estudo piloto no qual foi administrada a pravastatina dissolvida em salina estéril na dose de 20 mg/kg por via oral em ratos ($n=3$). A linearidade do método foi observada após a transformação log-log dos valores de x e y seguida da

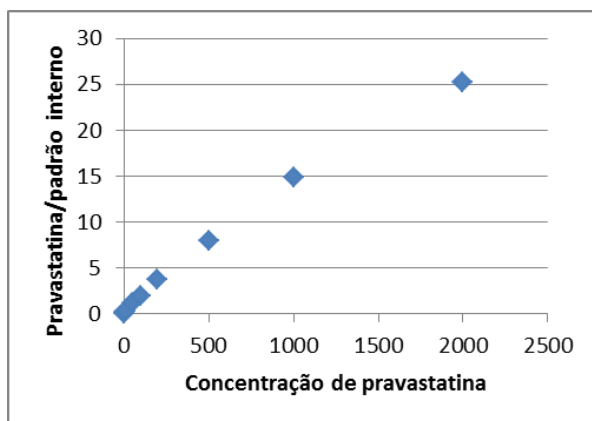
regressão linear. A utilização desse modelo foi necessária, pois as variâncias dos erros observados após regressão linear ordinária apenas não apresentaram homocedasticidade (Figura 9).

A ponderação dos dados através da transformação log-log é uma forma de minimizar a soma dos quadrados dos resíduos entre as observações e a linha de regressão construída (SINGTOROJ et al., 2006). Este artifício oferece vantagens em relação à regressão linear ordinária devido à diminuição do intervalo de calibragem após a transformação. Utilizando $\log x$ e $\log y$, a distância entre o ponto de menor concentração e o ponto de maior concentração da faixa de calibração irá diminuir e assim estabilizar a variância ao longo da curva de calibração e equilibrar a influência que cada um dos pontos exerce sobre a linha de regressão (SINGTOROJ et al., 2006).

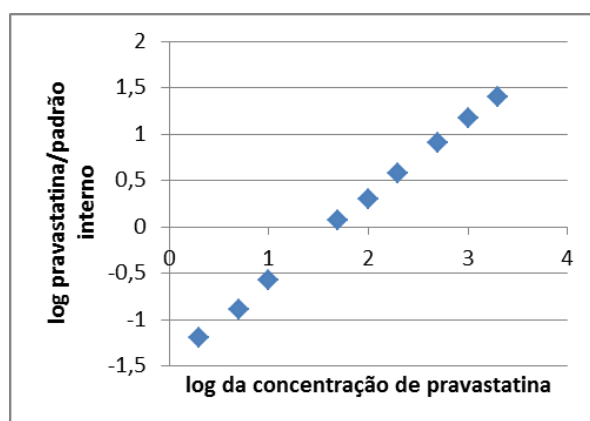
Quando os dados são heteroscedásticos (variância desigual) e são tratados através de regressão linear ordinária, os limites de quantificação podem ser superestimados. Por tratar-se de estudo farmacocinético de dose única no qual algumas amostras apresentam concentrações muito baixas do fármaco, tais desvios poderiam implicar em erros significativos na análise dos parâmetros farmacocinéticos (SINGTOROJ et al., 2006). O coeficiente de determinação com valor de 0,9979, bem como a observação de erros inferiores a 15% após a transformação log-log indica linearidade na faixa de concentração de 2 a 2000 ng/mL (Figuras 9 e 10). A Tabela 4 mostra os parâmetros da curva analítica para a quantificação da pravastatina em plasma.

Figura 9 – Linearidade do método. Os gráficos A e B representam a regressão linear ordinária entre a razão de área da pravastatina/padrão interno *versus* concentração de pravastatina e a regressão após transformação log-log dos mesmos dados, respectivamente. Os plots C e D mostram o *plote % erro versus log da concentração de pravastatina* para a regressão linear ordinária e a regressão após transformação log-log, respectivamente.

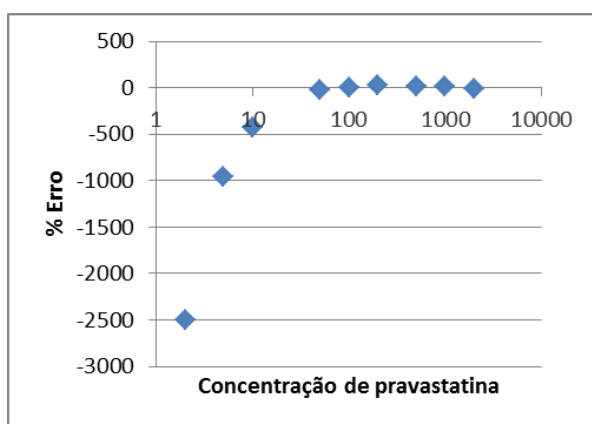
A)



B)



C)



D)

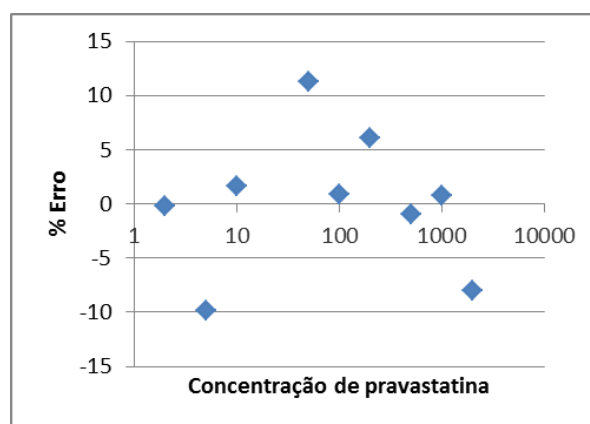


Figura 10 – Curva analítica da pravastatina em plasma de ratos utilizando a transformação log-log dos valores de x e y seguida da regressão linear.

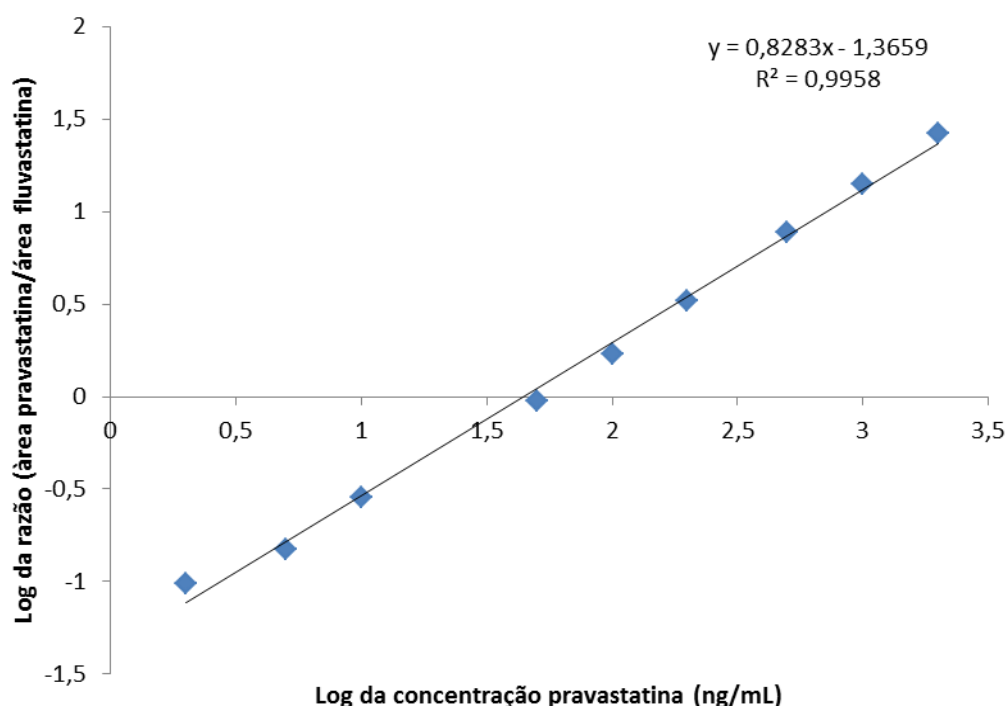


Tabela 4 – Curva analítica para a quantificação da pravastatina em plasma de ratos por LC–MS após transformação log-log seguida da regressão linear.

Parâmetro	Valor
Intervalo de concentrações (ng/mL)	2-2000
Coeficiente angular (a)	0,8283
Coeficiente linear (b)	1,3659
Coeficiente de determinação (r)	0,9979

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração analisada (2 ng/mL) a qual apresentou coeficiente de variação e erro padrão relativo inferiores a 20%. O LIQ de 2 ng/mL mostrou-se adequado para a análise da pravastatina em plasma de ratos até 8 horas após a administração de 20 mg/kg por via oral. Limites de quantificação similares foram relatados por Li et al. (2014) usando LC-MS e por Otter e Mignat (1998), Iacona et al. (1994) e Bauer et al. (2005) que usaram HPLC com detecção por ultravioleta. Entretanto, cabe ressaltar que os métodos que utilizam detecção por ultravioleta apresentaram o LIQ de 2 ng/mL partindo de amostras de 1 mL de plasma (IACONA et al., 1994; OTTER; MIGNAT, 1998; BAUER et al., 2005). Limites de quantificação inferiores foram

observados por Badolo et al. (2013), Aquilante et al. (2012), Deng et al. (2008) e Jain et al. (2007), utilizando LC-MS/MS e por Tayel et al. (2015) utilizando UHPLC-MS/MS. Ressaltamos que os equipamentos LC-MS/MS e UHPLC-MS/MS são equipamentos que oferecem elevada seletividade e sensibilidade, porém, não estão disponíveis em muitos laboratórios de pesquisa em função do seu elevado custo.

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas diferentes (intercorridas) através da análise em quintuplicatas das concentrações 2, 5, 500, 1500 e 5000 ng/mL de pravastatina em plasma. A precisão intracorrída e intercorrida foi avaliada através do coeficiente de variação com base em todos os valores obtidos, o qual não apresentou valor superior a 15% exceto para o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20% (Tabela 5). A exatidão intracorrída e intercorrida foi determinada através do erro padrão relativo (EPR) o qual apresentou valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas. Os resultados obtidos mostram que o método é preciso e exato.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras de CQB (5 ng/mL) e CQA (1500 ng/mL) foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva de calibração recém preparada foi utilizada para determinar a concentração das amostras. A estabilidade foi demonstrada, pois a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentou desvio superior a 15% (Tabela 5).

Tabela 5 – Limites de confiança do método de análise da pravastatina em plasma de rato por LC-MS.

	Pravastatina
Linearidade (2 – 2000 ng/mL)	$y=0,8283x - 1,3659$
r	0,9979
Precisão Interensaio (CV%, n=3)	
LIQ (2 ng/mL)	18,04
CQB (5 ng/mL)	11,81
CQM (500 ng/mL)	6,18
CQA (1500 ng/mL)	10,79
CQD (5000 ng/mL)	10,29
Precisão Intra-ensaio (CV%, n=5)	
LIQ (2 ng/mL)	9,29
CQB (5 ng/mL)	8,24
CQM (500 ng/mL)	6,46
CQA (1500 ng/mL)	4,87
CQD (5000 ng/mL)	6,46
Exatidão Interensaio (EPR%, n=3)	
LIQ (2 ng/mL)	3,97
CQB (5 ng/mL)	3,10
CQM (500 ng/mL)	10,45
CQA (1500 ng/mL)	2,09
CQD (5000 ng/mL)	5,24
Exatidão Intra-ensaio (EPR%, n=5)	
LIQ (2 ng/mL)	11,49
CQB (5 ng/mL)	-12,81
CQM (500 ng/mL)	11,84
CQA (1500 ng/mL)	-10,09
CQD (5000 ng/mL)	7,82
Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (6h a 23° C)	
CQB (5 ng/mL)	5,85
CQA (1500 ng/mL)	14,03
<i>Pós-processamento</i> (12h a 4° C)	
CQB (5 ng/mL)	-9,62
CQA (1500 ng/mL)	2,67
<i>Congelamento/descongelamento</i> (3 ciclos)	
CQB (5 ng/mL)	4,17
CQA (1500 ng/mL)	7,93

CV: coeficiente de variação $[(\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$; r: coeficiente de determinação; EPR: erro padrão relativo $\{[(\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal})/\text{valor nominal}] \times 100\}$; LIQ: limite de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição.

4.2. Influência da exposição ao tolueno por inalação na disposição cinética da pravastatina

Até a presente data, podem ser encontrados na literatura diversos estudos sobre os efeitos tóxicos do tolueno na saúde do trabalhador e em animais de experimentação (ATSDR, 2000; ACGIH, 2010). Além disso, a exposição ocupacional a agentes químicos é potencialmente capaz de modificar a disposição cinética e o metabolismo de fármacos (MATEUS et al., 2008; MATEUS et al., 2010; CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2015). Através do modelo experimental em que a exposição do animal ao agente químico se dá apenas pelo nariz (*Nose Only Exposure System*), o presente estudo buscou compreender pela primeira vez a influência da exposição ocupacional a solventes na atividade dos transportadores da família Oatp, usando a pravastatina como fármaco marcador.

Considerando os modelos experimentais utilizados para avaliação da exposição a solventes, a câmara de exposição do tipo *NOES* apresenta vantagens em relação ao modelo de exposição pelo corpo inteiro (*WBES - Whole-Body Exposure System*), no qual o animal fica imerso na atmosfera experimental. As vantagens da câmara tipo *NOES* em relação à câmara de exposição do tipo *WBES* incluem: a) menor volume de atmosfera necessário; b) melhor controle da concentração do solvente; c) maior uniformidade na exposição; d) exposição apenas pela via inalatória de forma a representar melhor a exposição ocupacional; e) possibilidade de reinalação improvável na câmara tipo *NOES* (DORATO; WOLFF, 1991; WONG, 2007).

O estudo investigou a influência da exposição inalatória de ratos *Wistar* ao tolueno na concentração de 85 mg/m³ durante o período de 6 horas/dia, cinco dias por semana, durante 4 semanas, simulando a jornada de trabalho de indivíduos expostos ao tolueno. Os dados de concentração plasmática da pravastatina *versus* tempo para os animais do grupo Controle-Pravastatina e do grupo Tolueno-Pravastatina estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente, e na Figura 13 como média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 11 – Concentrações plasmáticas da pravastatina em ratos tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg (grupo Controle-Pravastatina). Os animais do grupo Controle-Pravastatina (n=6 por tempo de coleta) foram expostos ao ar e mantidos na câmara de exposição tipo *NOES* e por 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas.

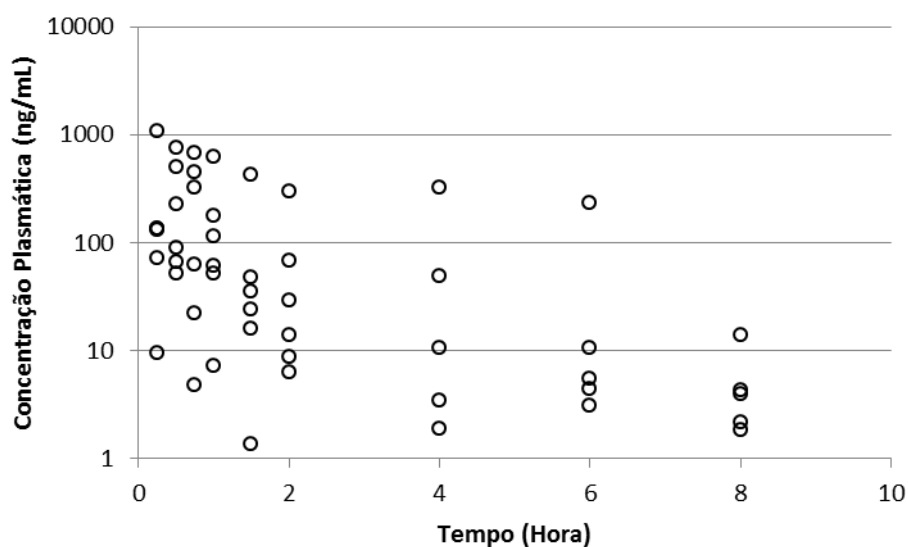


Figura 12 – Concentrações plasmáticas da pravastatina em ratos tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg (grupo Tolueno-Pravastatina). Os animais do grupo Tolueno-Pravastatina (n=6 por tempo de coleta) foram expostos ao tolueno 85 mg/m³ em câmara de exposição tipo *NOES* e por 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas.

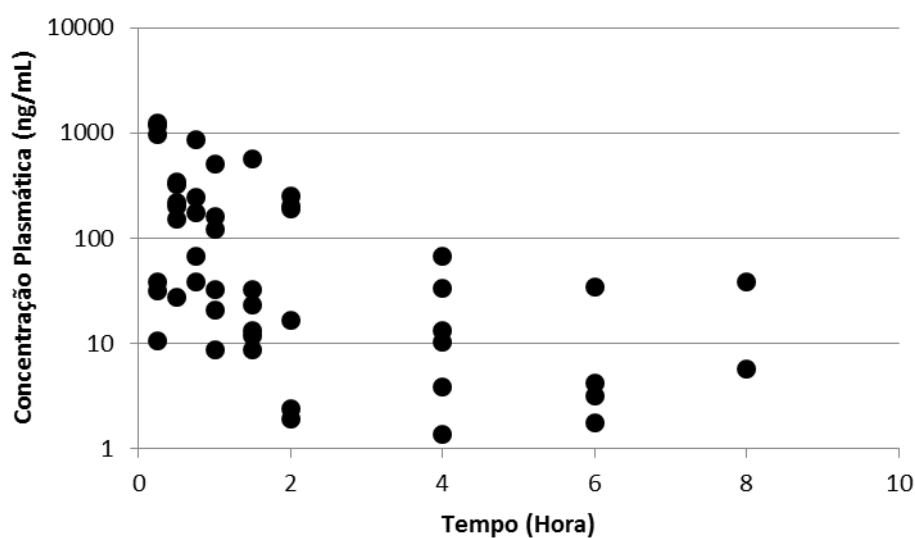
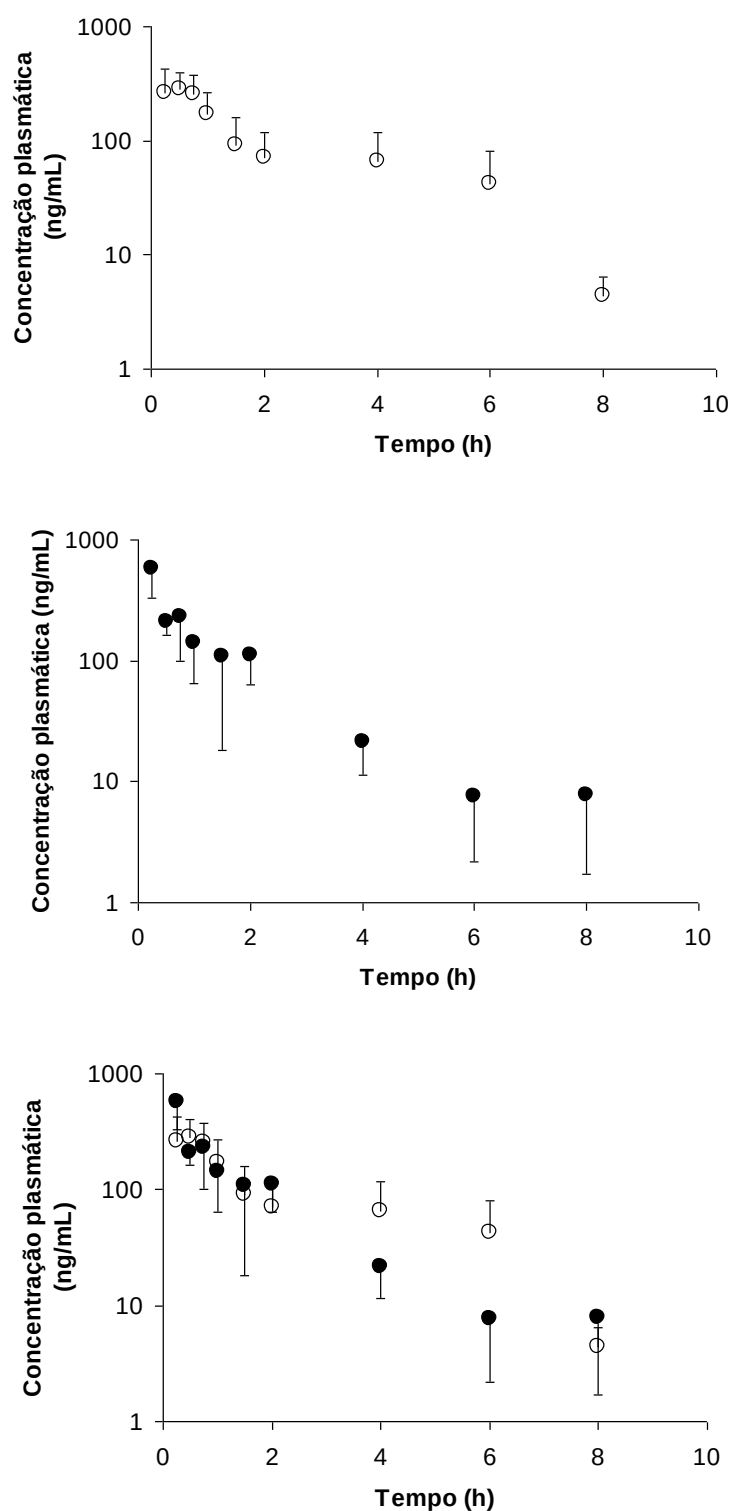


Figura 13 – Curvas da concentração plasmática *versus* tempo dos grupos Controle-Pravastatina (○) e Tolueno-Pravastatina (●). Os animais (n=6 por tempo de coleta) foram expostos ao ar (grupo Controle-Pravastatina) ou tolueno 85 mg/m³ (grupo Tolueno-Pravastatina) em câmara de exposição tipo NOES e por 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas. Após 4 semanas os animais foram tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg. Dados apresentados como média ± erro padrão da média.



A disposição cinética da pravastatina nos animais dos grupos Controle-Pravastatina e Tolueno-Pravastatina foi avaliada pelos parâmetros $ASC^{0-\infty}$ e Cl/F (Tabela 6). Os animais do grupo Controle-Pravastatina apresentaram valores médios de $ASC^{0-\infty}$ de 726,0 ng h/mL e Cl/F de 49,1 L/h/Kg. Os resultados observados são compatíveis com aqueles relatados por Badolo et al. (2013) que relataram ASC de 428 ± 95 ng h/mL e Cl/F de 46 ± 9 L/h/Kg após a administração de pravastatina 20 mg/Kg por via oral em ratos. Embora a comparação com estudos prévios que investigaram a disposição cinética da pravastatina em ratos seja válida, cabe ressaltar que no presente estudo, os animais do grupo controle foram submetidos à condição de estresse da restrição prolongada na câmara de exposição (Tabela 7).

Os animais do grupo Tolueno-Pravastatina apresentaram valores médios de $ASC^{0-\infty}$ e Cl/F de 681,8 ng h/mL e 31,2 L/h/Kg, respectivamente. Não houve diferença estatística para a $ASC^{0-\infty}$ ao comparar os grupos Controle-Pravastatina e Tolueno-Pravastatina através dos intervalos de confiança 95% para a diferença entre os valores dos parâmetros farmacocinéticos (Tabela 6).

Tabela 6 – Disposição cinética da pravastatina nos animais dos grupos controle e tolueno (n=6, para cada tempo de coleta). Dados apresentados como média, mediana e erro padrão da média.

		$ASC^{0-\infty}$ (ng h/mL)	Cl/F (L/h Kg)
Grupo Controle-Pravastatina	Média	726,0	49,1
	Mediana	490,8	50,0
	EPM	261,8	13,5
Grupo Tolueno-Pravastatina	Média	681,8	31,2
	Mediana	623,6	32,1
	EPM	80,1	3,2

$ASC^{0-\infty}$: área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; Cl/F : clearance total aparente; EPM: erro padrão da média

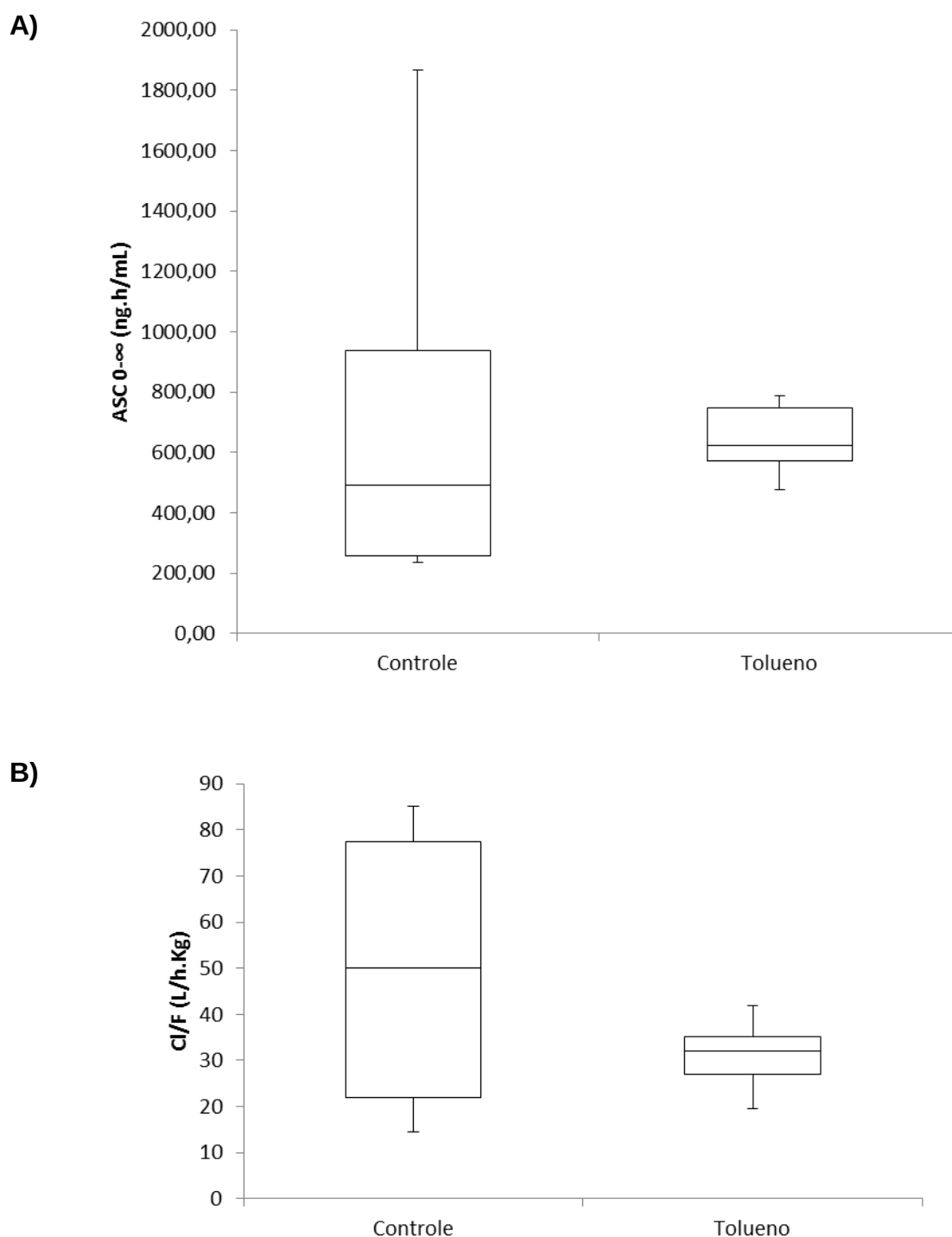
Tabela 7 – Disposição cinética da pravastatina em ratos tratados com dose única oral.

Fármaco	Via de Administração	Dose (mg/Kg)	ASC (ng h /mL)	Cl/F (L/h/Kg)	Referência
Pravastatina	Oral	20	428 ± 95	46 ± 9	BADOLO et al; 2013
Pravastatina	Oral	20	63,0 ± 34,3	-	KIVISTÖ et al; 2005
Pravastatina	Oral	200	2290 ± 380	89,11 ± 15	NABA et al; 2004
Pravastatina	Oral	20	726,0 ± 261,8	49,1 ± 13,5	Presente estudo

ASC= área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo; Cl/F=clearance total aparente

Nota-se maior variabilidade dos parâmetros $ASC^{0-\infty}$ e Cl/F para os animais do grupo Controle-Pravastatina quando comparados aos animais do grupo Tolueno-Pravastatina (Figura 14). Ressaltamos que o tolueno apresenta efeito depressor no SNC decorrente da interação reversível entre o tolueno e componentes das membranas do sistema nervoso (ATSDR, 2000). Assim sendo, a menor variabilidade na disposição cinética da pravastatina nos animais expostos ao tolueno pode ser explicada pelo menor estresse decorrente da restrição prolongada na câmara de exposição (por 6 horas/dia, 5 dias/semana, 4 semanas) associada ao solvente quando comparados aos animais do grupo Controle-Pravastatina, que permanecem nas mesmas condições de restrição prolongada, mas sem a exposição ao solvente.

Figura 14 – Parâmetros farmacocinéticos $ASC^{0-\infty}$ (A) e Cl/F (B) da pravastatina nos animais do grupo Controle-Pravastatina e do grupo Tolueno-Pravastatina. Os animais ($n=6$ por tempo de coleta) foram expostos ao ar (grupo Controle-Pravastatina) ou tolueno 85 mg/m^3 (grupo Tolueno-Pravastatina) em câmara de exposição tipo *NOES* e por 6 horas diárias, 5 vezes por semana, durante 4 semanas. Após 4 semanas os animais foram tratados com dose única oral (gavagem) de 20 mg/kg . A mediana é representada pela linha no interior do retângulo; a linha inferior representa o percentil 25 e a linha superior representa o percentil 75; as barras de erros representam os valores de máximo e mínimo.



Wang et al. (1993) demonstraram que a atividade de CYP2B1/2, CYP2E1 e CYP3A1 é induzida em ratos machos adultos expostos ao tolueno, enquanto que a atividade de CYP2C11/6 e de CYP2A1 é inibida. A exposição a tolueno a 375 ppm, 6 horas/dia durante 5 dias resultou em inibição significativa da atividade de arilhidrocarboneto hidroxilase (AHH), CYP2B1, CYP4B1 nos pulmões, mas não do CYP1A1. Após a exposição a níveis mais baixos de tolueno (125 ppm, 6 horas/dia, 3 dias), a atividade da AHH, CYP2B1 e CYP4B1 também encontravam-se reduzidas, porém de maneira dose-dependente (FURMAN; SILVERMAN; SCHATZ, 1998). Nakajima et al. (1997) relataram que ratos expostos a concentrações maiores que 1000 ppm por um período de 6 horas apresentaram indução do CYP2E1. Os autores relatam ainda indução do CYP2B1/2 e do CYP3A1/2 em exposição superior a 2000 ppm e inibição de CYP2C11/6 após exposição a concentrações de 4000 ppm. Estudos realizados em microsossomos hepáticos de ratos expostos ao tolueno a 4000 ppm por 6 horas em câmara de exposição dinâmica revelam indução de CYP2E1, CYP2B1/2, CYP2A1 e CYP4A1; redução do CYP2C11 e pequeno efeito nos CYP3A, CYP2C13 e CYP1A1 (WANG et al., 1996) (Tabela 1). De maneira similar, Gut et al. (1993) observaram indução na atividade de CYP2B1 e CYP2E1 ao expor os animais a uma dose de tolueno de 4 mg/L, 20 horas/dia por 4 dias por inalação. Entretanto, resultados contraditórios aos relatados por Wang et al. (1996) foram relatados para o CYP2A1, cuja atividade foi inibida após exposição a 4 mg/L, 20 horas/dia por 4 dias em ratos.

A exposição ao tolueno a 25, 50 e 100 ppm, 6 horas/dia, durante 5 dias usando câmara do tipo NOES resultou em perda na enantiosseletividade na farmacocinética do verapamil e norverapamil (MATEUS et al., 2008). Não foram encontrados na literatura outros estudos que investigam a influência da exposição ao tolueno na disposição cinética de outros fármacos ou na expressão de transportadores de fármacos.

A pravastatina é descrita como substrato do transportador OATP1B1 hepático e tem sido usada como fármaco marcador da sua atividade. Estudos clínicos e estudos *in vitro* tem demonstrado que alterações na disposição cinética da pravastatina são observadas quando a atividade de OATP1B1 é inibida (KIVISTÖ et al., 2005; NIEMI, 2007; WATANABE et al., 2009; SHARMA et al., 2012). Um aumento de 2,5 vezes na ASC da pravastatina foi observado após coadministração com o inibidor de OATP1B1 espironolactona em ratos (BADOLO et al., 2013). Os

resultados do presente estudo mostram que a atividade dos transportadores da família Oatp, avaliada pelo uso da pravastatina como fármaco marcador, não foi alterada após a exposição ao tolueno por inalação a 85 mg/m³, 6 horas/dia, 5 dias/semana, 4 semanas em ratos.

5. CONCLUSÕES

- Foi desenvolvido e validado método de análise da pravastatina em plasma de ratos por LC-MS;
- O método validado mostrou detectabilidade, precisão e exatidão compatíveis com a aplicação em estudos para a investigação da disposição cinética após dose única da pravastatina em ratos;
- A exposição ao tolueno 85 mg/m^3 , 6 h/dia, 5 dias/semana, 4 semanas não alterou a disposição cinética da pravastatina em ratos tratados com 20 mg/kg do fármaco.
- A atividade dos transportadores da família Oatp, avaliada pelo uso da pravastatina como fármaco marcador, não foi alterada após a exposição ao tolueno por inalação a 85 mg/m^3 , 6 horas/dia, 5 dias/semana, 4 semanas em ratos.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for toluene**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2000. p. 357. Disponível em: www.atsdr.cdc.gov. Acesso em: 10/02/2016

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). Documentation of the TLVs[®] and BEIs[®] with other worldwide occupational exposure values. Cincinnati, OH, 2010, 1-CD-ROM.

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

AQUILANTE, C. L.; KISER, J. J.; ANDERSON, P. L.; CHRISTIANS, U.; Kosmiski, L. A.; Daily, E. B.; Hoffman, K. L.; Hopley, C.W.; Predhomme, J. A.; Schniedewind, B.; Sidhom, M. S. Influence of *SLCO1B1* polymorphisms on the drug-drug interaction between darunavir/ritonavir and pravastatin. **J Clin Pharmacol**, v. 52, n. 11, p. 1725-38, Nov. 2012.

BACKMAN, J. T.; KYRKLUND, C.; NEUVONEN, M.; NEUVONEN, P. J. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. **Clin Pharmacol Ther**, v. 72, p. 685-691, Dez. 2002.

BADÉE, J.; ACHOUR B.; ROSTAMI-HODJEGAN A.; GALETIN A. Meta-analysis of expression of hepatic organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporters in cellular systems relative to human liver tissue. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 4, p. 424-432, 2015.

BADOLO, L.; BUNDGAARD, C.; GARMER, M.; JENSEN, B. The role of hepatic transport and metabolism in the interactions between pravastatin or repaglinide and two rOatp inhibitors in rats. **Eur J Pharm Sci**, v. 49, n. 4, p. 767-772, Jul. 2013

BAUER, S.; MWINYI, J.; STOECKLE, A.; GERLOFF, T.; ROOTS, I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 818, n. 2, p. 257-262, Abr. 2005.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Disponível em: www.anvisa.com.br. Acesso em: 01/07/2015.

BRASIL – MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Portaria 3214 de 08/06/1978a. Norma Regulamentadora N 15: Atividades e operações insalubres; anexo N° 11**. Disponível em: www.mte.gov.br. Acesso em: 22/07/2015.

BRASIL – MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO. **Portaria 3214 de 8/6/1978b. Norma Regulamentadora N 7: Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO)**. Disponível em: www.mte.gov.br. Acesso em: 16/10/2014.

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

CARDENAS-ROJAS, M. I.; DELGADO-ENCISO, I.; BALTAZAR-RODRIGUEZ, L. M.; GUZMAN-ESQUIVEL, J.; RAMIREZ-FLORES, M. Effects of the *SLCO1B1**1 and *SLCO1B1**5 polymorphisms on IL-6 and IL-10 levels in patients under pravastatin treatment prior to inguinal hernia repair. **International Journal of Surgery**, v. 27, p. 105-109, 2016.

CARDOSO, J. L.; LANCHOTE, V. L.; PEREIRA, M. P.; CAPELA, J. M.; DE MORAES, N. V. Impact of inhalational exposure to ethanol fuel on the pharmacokinetics of verapamil, ibuprofen and fluoxetine as in vivo probe drugs for CYP3A, CYP2C and CYP2D in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 99-105, 2015.

CARDOSO, J. L.; LANCHOTE, V. L.; PEREIRA, M. P.; CAPELA, J. M.; LEPERA, J. S. Influence of gasoline inhalation on the enantioselective pharmacokinetics of fluoxetine in rats. **Chirality**, v. 25, n. 3, p. 206-210, 2013.

CUI, Y.; KONIG, J.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; KEPPLER, D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC1A6. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 13, p. 9626-30, 2001.

DELLA ROSA, H. V. et al. Monitoramento Ambiental e Biológico. In: **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. cap. 3, p. 252–275.

DENG, J. W.; KIM, K. B.; SONG, I. S.; SHON, J. H.; ZHOU, H. H.; LIU, K. H.; SHIN, J. G. Determination of two HMG-CoA reductase inhibitors, pravastatin and pitavastatin, in plasma samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmaceutical study. **Biomed Chromatogr**, v. 22, n. 2, p. 131-5, Feb. 2008.

DIEHL, K. H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M.; van de VORSTENBOSCH, C.; European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **J Appl Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

DORATO, M. A.; WOLFF, R. K. Inhalation exposure technology, dosimetry, and regulatory issues. **Toxicol Pathol**, v. 19, p. 373-383, 1991.

EVERETT, D.W.; CHANDO, T. J.; DIDONATO, G. C.; SINGHVI, S. M.; PAN, H. Y.; WEINSTEIN, S. H. Biotransformation of pravastatin sodium in humans. **Drug Metab Dispos**, v. 19, p. 740-748, 1991.

FURMAN, G. M.; SILVERMAN, D. M.; SCHATZ R. A. Inhibition of rat lung mixed function oxidase activity following repeated low-level toluene inhalation: possible role of toluene metabolites. **J Toxicol Environ Health A**, v. 54, n. 8, p. 633-645, 1998.

GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; CHU, Z.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M.; HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L. Membrane transporters in drug development. **Nat Rev Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215-236, 2010.

GLAESER, H.; BAILEY, D. G.; DRESSER, G. K.; GREGO, J. C.; SCHWARZ, U. I.; MCGRATH, J. S.; JOLICOEUR, E.; LEE, W.; LEAKE, B. F.; TIRONA, R. G.; KIM, R. B. Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. **Clin Pharmacol Ther**, v. 81, n. 3, p. 362-370, 2007.

GRAPCI A. D.; DIMOVSKI A. J.; KAPEDANOVSKA A.; VAVLUKIS M.; EFTIMOV A.; GESHKOVSKA N. M.; LABACHEVSKI N.; JAKJOVSKI K.; GORANI D.; KEDEV S.; MLADENOVSKA K. Frequencies of single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of the *SLCO1B1* gene in selected populations of the western balkans. **Balkan J. Med. Genetics**, v. 18, n. 1, p. 5–21, 2015.

GRUBE, M.; KOCK, K.; OSWALD, S.; DRABER, K.; MEISSNER, K.; ECKEL, L.; BOHM, M.; FELIX, S. B.; VOGELGESANG, S.; JEDLITSCHKY, G.; SIEGMUND, W.; WARZOK, R.; KROEMER, H. K. Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. **Clin Pharmacol Ther**, v. 80, n. 6, p. 607-620, 2006.

GUT, I.; TELELIUS, Y.; FRANTIK, E.; LINHART, I.; SOUCEK, P.; FILIPCOVÁ, B.; KLUCKOVÁ, H. Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochromes P450 2b1 in rat liver. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 67, p. 237-243, 1993.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. **Pflügers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 653-665, 2004.

HASEGAWA, Y.; KISHIMOTO, S.; SHIBATANI, N.; INOTSUME, N.; TAKEUCHI, Y.; FUKUSHIMA, S. The disposition of pravastatin in a rat model of streptozotocin-induced diabetes and organic anion transporting polypeptide 2 and multidrug resistance-associated protein 2 expression in the liver. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 1, p. 153-156, 2010.

HATANAKA, T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. **Clin Pharmacokinet**, v. 39, n. 6, p. 397-412, 2000.

HEDIGER, M. A.; ROMERO, M. F.; PENG, J-B.; ROLFS, A.; TAKANAGA, H.; BRUFORS, E. A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. **Pflugers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 465-468, 2004.

HJELM, E. W.; NASLUND, P. H.; WALLEN, M. Influence of cigarette smoking on the toxicokinetics of toluene in humans. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 25, n. 2, p. 155-163, 1988.

HO, R. H.; TIRONA, R. G.; LEAKE, B. F.; GLAESER, H.; LEE, W.; LEMKE, C. J.; WANG, Y.; KIM, R. B. Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake; function, expression and pharmacogenetics. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1793-1806, 2006.

HSIANG, B.; ZHU, Y.; WANG, Z.; WU, Y.; SASSEVILLE, V.; YANG, W. P.; KIRCHGESSNER, T. G. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 52, p. 37161-37168, 1999.

IACONA, I.; REGAZZI, M. B.; BUGGIA, I.; VILLANI, P.; FIORITO, V.; MOLINARO, M.; GUARNONE, E. High-performance liquid chromatography determination of pravastatin in plasma. **Therapeutic drug monitoring**, v. 16, n. 2, p. 191-195, 1994.

IDE, T.; SASAKI, T.; MAEDA, K.; HIGUCHI, S.; SUGIYAMA, Y.; IEIRI, I. Quantitative population pharmacokinetic analysis of pravastatin using an enterohepatic circulation model combined with pharmacogenomic information on *SLCO1B1* and *ABCC2* polymorphisms. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 49, n. 11, p. 1309-1317, 2009.

INGEIMAN-SUNDBERG, M. Implications of polymorphic cytochrome P-450 dependent drug metabolism for drug development. **Drug Metab. Dispos.**, v. 29, p. 570-573, 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: volume 71 re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Lyon, 1999.

IUSUF, D.; SPARIDANS, R. W.; ESCH, A. V.; HOBBS, M.; KENWORTHY, K. E.; van de STEEG, E. ; WAGENAAR, E.; BEIJNEN, J. H.; SCHINKEL, A. H. Organic anion-transporting polypeptides 1a/1b control the hepatic uptake of pravastatin in mice. **Mol. Pharm.**, v. 9, n. 9, p. 2497-504, 2012.

JACOBSEN, W.; KIRCHNER, G.; HALLENSLEBEN, K.; MANCINELLI, L.; DETERS, M.; HACKBARTH, I.; BENET, L. Z.; SEWING, K.; CHRISTIANS, U. Comparison of cytochrome P-450-dependent metabolism and drug interactions of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors lovastatin and pravastatin in the liver. **Drug Metab. Dispos.**, v. 27, n. 2, p. 173-179, 1999.

JAIN, D. S.; SUBBAIAH, G.; SANYAL, M.; JAIN, V. K.; SHRIVASTAV, P. A rapid and specific approach for direct measurement of pravastatin concentration in plasma by LC-MS/MS employing solid-phase extraction. **Biomed. Chromatogr**, v. 21, n. 1, p. 67-78, 2007.

KALLIOKOSKI, A.; NIEMI, M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. **Br. J. Pharmacol.**, v. 158, n. 3, p. 693-705, 2009.

KAMEYAMA, Y.; YAMASHITA, K.; KOBAYASHI, K.; HOSOKAWA, M.; CHIBA, K. Functional characterization of *SLCO1B1* (OATP-C) variants, *SLCO1B1**5, *SLCO1B1**15 and *SLCO1B1**15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. **Pharmacogenet Genomics**, v. 15, n. 7, p. 513-522, 2005.

KAWABATA, K.; MATSUSHIMA, N.; SASAHARA, K. An automated method for the simultaneous determination of pravastatin and its main metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Biomed. Chromatogr**, v. 12, n. 5, p. 271-5, 1998.

KIVISTÖ, K. T.; GRISK, O.; HOFMANN, U.; MEISSNER, K.; MÖRITZ, K. U.; RITTER, C.; ARNOLD, K. A.; LUTJÖHANN, D.; Von BERGMANN, K.; KLÖTING, I.; EICHELBAUM, M.; KROEMER, H. K. Disposition of oral and intravenous pravastatin in MRP2-deficient TR-rats. **Drug Metab. Dispos.**, v. 33, n. 11, p. 1593-1596, 2005.

KNOP, J. MISAKA S.; SINGER K.; HOIER E.; MULLER F.; GLAESER H.; KONIG J.; FROMM M. F. Inhibitory effects of green tea and (-)-epigallocatechin gallate on transport by OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K and P-glycoprotein. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2015.

KOBAYASHI, D.; NOZAWA, T.; IMAI, K.; NEZU, J.; TSUJI, A.; TAMAI, I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 306, n. 2, p. 703-708, 2003.

KODAVANTI, P. R.; ROYLAND, J. E.; MOORE-SMITH, D. A.; BESAS, J.; RICHARDS, J. E.; BEASLEY, T. E.; EVANSKY, T. ; BUSHNELL, P. J. Acute and subchronic toxicity of inhaled toluene in male Long-Evans rats: Oxidative stress markers in brain. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 10-19, 2015.

KOTSAMPASAKOU, E.; BRENNER S.; JAGER W.; ECKER G. F. Identification of Novel Inhibitors of Organic Anion Transporting Polypeptides 1B1 and 1B3 (OATP1B1 and OATP1B3) Using a Consensus Vote of Six Classification Models. **Mol. Pharm**, v. 12, n. 12, p. 4395-404, 7 dez. 2015.

LEE, H. H.; LEAKE, B. F.; TEFT, W.; TIRONA, R. G.; KIM, R.B.; HO, R. H. Contribution of hepatic organic anion-transporting polypeptides to docetaxel uptake and clearance. **Mol. Cancer Ther**, v. 14, n. 4, p. 994-1003, abr. 2015.

LEPERA, J. S.; COLACIOPPO, S. Occupational exposure to paint solvents and particulate material in car repair shops. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 18, p. 49-55, 2005.

LI, F.; ZHANG, M.; XU, D.; LIU, C.; ZHONG, Z. Y.; JIA, L. L.; HU, M. Y.; YANG, Y.; LIU, L.; LIU, X. D. Co-administration of paroxetine and pravastatin causes deregulation of glucose homeostasis in diabetic rats via enhanced paroxetine exposure. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 35, n. 6, p. 792-805, 2014.

LIU, L.; CUI, Y.; CHUNG, A. Y.; SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y.; KEPPLER, D.; PANG, K. S. Vectorial transport of enalapril by Oatp1a1/Mrp2 and OATP1B1 and OATP1B3/MRP2 in rat and human livers. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, n. 1, p. 395-402, 2006.

LOF, A.; WALLEN, M.; WIGAEUS HJELM, E. Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 66, n. 2, p. 138-41, 1990.

MAEDA, K. Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as Important Regulators of the Pharmacokinetics of Substrate Drugs. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 38, n. 2, p. 155-168, 2015.

MAEDA, K.; IEIRI, I.; YASUDA, K.; FUJINO, A.; FUJIWARA, H.; OTSUBO, K.; HIRANO, M.; WATANABE, T.; KITAMURA, Y.; KUSUHARA, H.; SUGIYAMA, Y. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 79, n. 5, p. 427-429, 2006.

MATEUS, F. H.; LEPERA, J. S.; MARQUES, M. P.; BORALLI, V. B.; LANCHOTE, V. L. Reduction of enantioselectivity in the kinetic disposition and metabolism of verapamil in rats exposed to toluene. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 86, n. 5, p. 232-239, 2008.

MATEUS, F. H.; LEPERA, J. S.; MARQUES, M. P.; BORALLI, V. B.; LANCHOTE, V. L.; Influence of N-hexane inhalation on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of verapamil in rats. **Chirality**, v. 22, n. 1, p. 29-34, 2010.

MIZUNO, D.; HIROI, T.; NG, P.; KISHIMOTO, W.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y. Regulation of CYP2D expression in rat brain by toluene. **Osaka City Med. J.**, v. 49, n. 1, p. 49-56, 2003.

NABA, H.; KUWAYAMA, C.; KAKINUMA, C.; OHNISHI, S.; OGIHARA, T. Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) as an animal model affording high drug-exposure in toxicity studies on organic anions. **Drug Metab. Pharmacokinet.**, v. 19, n. 5, p. 339-351, 2004.

NADEAU, V.; TRUCHON, G.; BROCHU, M.; TARDIF, R. Effect of physical exertion on the biological monitoring of exposure of various solvents following exposure by inhalation in human volunteers: I. Toluene. **J. Occup. Environ. Hyg.**, v. 3, n. 9, p. 481-489, 2006.

NAKAGOMI-HAGIHARA, R.; NAKAI, D.; TOKUI, T.; ABE, T.; IKEDA, T. Gemfibrozil and its glucuronide inhibit the hepatic uptake of pravastatin mediated by OATP1B1. **Xenobiotica**, v. 37, n. 5, p. 474-486, 2007.

NAKAJIMA, T.; WANG, R. S.; ELOVAARA, E.; GONZALEZ, F. J.; GELBOIN, H. V.; RAUNIO, H.; PELKONEN, O.; VAINIO, H.; AOYAMA, T. Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, n. 3, p. 271-277, 1997.

NIEMI, M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 7, p. 787-802, 2007.

NIEMI, M.; PASANEN, M. K.; NEUVONEN, P.J. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, n. 1, p. 157-181, 2011.

OTTER, K.; MIGNAT, C. Determination of pravastatin in human plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.**, v. 708, p. 235-241, 1998.

PARK, W. K. C.; KENNEDY, R. M.; LARSEN, S. D.; MILLER, S.; ROTH, B. D.; SONG, Y.; STEINBAUGH, B. A.; SUN, K.; TAIT, B. D.; KOWALA, M. C.; TRIVEDI, B. K.; AUERBACH, B.; ASKEW, V.; DILLON, L.; HANSELMAN, J. C.; LIN, Z.; LU, G. H.; ROBERTSON, A.; SEKERKE, C. Hepatoselectivity of statins: design and synthesis of 4-sulfamoyl pyrroles as HMG-CoA reductase inhibitors. **Bioorg Med. Chem. Lett.**, v. 18, n. 3, p. 1151-1156, 2008.

PENG, J. F.; LIU, L.; GUO, C.X.; LIU, S.K.; CHEN, X. P.; HUANG, L. H.; XIANG, H.; HUANG, Z. J.; YUAN, H.; YANG, G. P. Role of miR-511 in the regulation of OATP1B1 expression by free fatty acid. **Biomol. Ther.**, v. 23, n. 5, p. 400–406, 2015.

PFEIFER, N. D.; HARDWICK, R. N.; BROUWER, K. L. R. Role of hepatic efflux transporters in regulating systemic and hepatocyte exposure to xenobiotics. **Annu. Rev. Pharmacol. toxicology**, v. 54, p. 509-535, 2014.

POLAGANI, S. R.; PILLI, N. R.; GANDU, V. High performance liquid chromatography mass spectrometric method for the simultaneous quantification of pravastatin and aspirin in human plasma: Pharmacokinetic application. **J. Pharm. Anal.**, v. 2, n. 3, p. 206-213, 2012.

PRADO, Y.; SAAVEDRA, N.; ZAMBRANO, T.; LAGOS, J.; ROSALES, A.; SALAZAR, L. A. *SLCO1B1* c.388A>G Polymorphism Is Associated with HDL-C Levels in Response to Atorvastatin in Chilean Individuals. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 9, p. 20609–20619, 31 ago. 2015.

ROTH, M.; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the *SLCO* and *SLC22A* gene superfamilies. **Br. J. Pharmacol.**, v.165, n. 5, p. 1260-1287, 2012.

SANDHU, P.; LEE, W.; XU, X.; LEAKE, B. F.; YAMAZAKI, M.; STONE, J. A.; LIN, J.H.; PEARSON, P. G.; KIM, R. B. Hepatic uptake of the novel antifungal agent caspofungin. **Drug Metab Dispos**, v. 33, n. 5, p. 676-682, 2005.

SANTOS, A. F. Determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários por cromatografia em fase gasosa visando a biomonitorização de trabalhadores expostos ao tolueno e xileno. 2001. Biblioteca Virtual de Teses e Dissertações, São Paulo, 117f., 2001. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9137/tde-23012015-150441/ptbr.php>>. Acesso em: 20 junh. 2016.

SHARMA, P.; BUTTERS, C. J.; SMITH, V.; ELSBY, R.; SURRY, D. Prediction of the in vivo OATP1B1-mediated drug-drug interaction potential of an investigational drug against a range of statins. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 47, n. 1, p. 244-255, 2012.

SINGTOROJ, T.; TARNING, J.; ANNERBERG, A.; ASHTON, M.; BERGQVIST, Y.; WHITE, N. J.; LINDEGARDH, N.; DAY, N. P. J. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, n. 1, p. 219-227, 2006.

SMITH, N. F.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Role of liver-specific transporters OATP1B1 and OATP1B3 in governing drug elimination. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 1, n. 3, p. 429-445, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Qualitative and quantitative analysis. In: _____. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. Cap. 11, p. 499-531.

SPARIDANS, R. W.; IUSUF, D.; SCHINKEL, A. H.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for pravastatin and two isomeric metabolites in mouse plasma and tissue homogenates. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 878, n. 28, p. 2751-2759, 2010.

TAYEL, S. A.; NABARAWI, M. A. E.; TADROS, M. I.; ABD-ELSALAM, W. H. Duodenum-triggered delivery of pravastatin sodium via enteric surface-coated nanovesicular spanlastic dispersions: Development, characterization and pharmacokinetic assessments. **Int. J. Pharm.**, v. 483, p. 77-88, 2015.

TIRONA, R. G.; LEAKE, B. F.; WOLKOFF, A. W.; KIM, R. B. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 304, n. 1, p. 223-228, 2003.

TREIBER, A.; SCHNEITER, R.; HAUSLER, S.; STIEGER, B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporine A, rifampicin, and sildenafil. **Drug Metab. Dispos.**, v. 35, n. 8, p. 1400-1407, 2007.

TSAI, P. L.; TSAI, T. H. Measurement of unbound pravastatin in rat blood and bile on the perspective of hepatobiliary excretion and its interaction with cyclosporin A and berberine. **Anal. Chim. Acta**, v. 548, n. 1, p. 33-40, 2005.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Toxicological review of toluene. Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington D. C., 2005.

van GIERBERGEN, P. L.; TREIBER, A.; SCHNEITER, R.; DIETRICH, H.; DINGEMANSE, J. Inhibitory and inductive effects of rifampin on the pharmacokinetics of bosentan in health subjects. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 81, n. 3, p. 414-419, 2007.

VAVRICKA, S. R.; Van MONTFOORT, J.; HA, H. R.; MEIER, P. J.; FATTINGER, K. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. **Hepatology**, v. 36, n. 1, p. 164-172, 2002.

WANG, R. S.; NAKAJIMA, T.; PARK, S. S.; GELBOIN, H. V.; MURAYAMA, N. Monoclonal antibody-directed assessment of toluene induction of rat hepatic cytochrome P450 isozymes. **Biochem. Pharmacol.**, New York, v. 46, n. 3, p. 413-419, 1993.

WANG, R. S.; NAKAJIMA, T.; TSURUTA, H.; HONMA, T. Effect of exposure to four organic solvents on hepatic cytochrome P450 isozymes in rat. **Chem. Biol. Interact**, v. 99, n.1-3, p. 239-252, 1996.

WANG, X.; WANG, Y. On-line extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry for quantitation of pravastatin and its metabolite in human serum. **Biomed. Chromatogr.**, v. 22, n.7, p. 719-26, 2008.

WATANABE, T.; KUSUHARA, H.; MAEDA, K.; SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.328, n. 2, p. 652-662, 2009.

WONG, B. A. Inhalation exposure system: design, methods and operation. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, n. 1, p. 3-14, 2007.

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 21/2014

Interessada: Profª Drª NATÁLIA VALADARES DE MORAES

Projeto: Influência da exposição ao tolueno na disposição cinética de pravastatina e digoxina e na atividade de OATP1B1 eglicoproteína-P em ratos

Parecer nº 38/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Influência da exposição ao tolueno na disposição cinética de pravastatina e digoxina e na atividade de OATP1B1 eglicoproteína-P em ratos”, apresentado pela Profª Drª NATÁLIA VALADARES DE MORAES, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em NOVEMBRO de 2016, em formulário para este fim.

Araraquara, 30 de junho de 2014.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO II – Adequação aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP

Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 21/2014

Pesquisadora: PROF^a. DR^a. NATÁLIA VALADARES DE MORAES

Projeto: Influência da exposição ao tolueno na disposição cinética de pravastatina e digoxina e na atividade de OATP1B1 e glicoproteína-P em ratos

Parecer nº 53/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 26 de novembro de 2014, analisou e aprovou o pedido de alteração do protocolo para uso de animais na pesquisa “Influência da exposição ao tolueno na disposição cinética de pravastatina e digoxina e na atividade de OATP1B1 e glicoproteína-P em ratos”, apresentado pela PROF^a. DR^a. NATÁLIA VALADARES DE MORAES, do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em NOVENBRO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 05 de dezembro de 2014.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA