

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALBERTO THALISON SILVEIRA

**INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO TOLUENO**

Alfenas/MG

2016

ALBERTO THALISON SILVEIRA

**INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO TOLUENO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Toxicologia e análises toxicológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara.

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silveira, Alberto Thalison.

Influência do diazepam nos níveis dos bioindicadores de exposição ocupacional ao tolueno / Alberto Thalison Silveira. – Alfenas - MG, 2016.
98 f.

Orientadora: Isarita Martins Sakakibara.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Tolueno. 2. Diazepam. 3. Exposição ocupacional. 4. Cresóis.
I. Sakakibara, Isarita Martins. II. Título.

CDD-615.9

ALBERTO THALISON SILVEIRA

“Influência do diazepam nos níveis dos bioindicadores de exposição ocupacional ao tolueno”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 25/02/2016

Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. José Salvador Lepera
Instituição: UNESP

Assinatura: 

Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho com carinho e gratidão
aos meus pais, Maria Aparecida e Carlos
Alberto, aos meus irmãos, Laís e José Paulo
e à minha namorada Isaura.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me apoiou em minhas escolhas e caminhos, me dando força, coragem, carinho e alegrias;

À minha orientadora Profa. Dra. Isarita Martins Sakakibara, por ter me recebido como orientado, tornando possível a realização deste trabalho. Por ter me dado toda atenção, confiança e apoio;

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP por dividir seu conhecimento conosco e participar de forma ativa no desenvolvimento deste projeto;

Aos professores Dr. Eduardo Costa de Figueiredo e Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques por sempre estarem disponíveis para ajudar em o que fosse preciso;

À Profa. Dra. Walnéia Aparecida de Souza pela ajuda fornecida nos passos iniciais deste trabalho;

Aos professores Dr. Eduardo Costa de Figueiredo, Dra. Márcia Helena Miranda Cardoso Podestá e Dr. José Salvador Lepera pelos conhecimentos compartilhados nas bancas do exame de qualificação e da defesa.

Aos amigos Henrique Dipe de Faria, Taila Kawano, Lellis Henrique Costa e Ana Carolina C. Albuquerque pela amizade, companheirismo e pelo apoio desde o início do mestrado até o final;

A todos os amigos e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos - LATF, pela amizade, pela força, pelo carinho e pelo apoio a mais um trabalho científico;

À CAPES, FAPEMIG e UNIFAL-MG pelo apoio financeiro e oportunidade;

Agradeço a Deus, que meu deu força, coragem e fé para acreditar que este trabalho seria possível;

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O tolueno (TOL) é um hidrocarboneto aromático amplamente utilizado em colas, tintas, detergentes, corantes, gasolina, solventes para tintas e produtos farmacêuticos. A exposição ao TOL pode ocorrer através da via inalatória e dérmica, no local de trabalho ou como droga de abuso. A literatura tem relatado a influência de alguns fármacos, como o etanol e o fenobarbital, na cinética de biotransformação do TOL devido interações no citocromo P450 (CYP). Os benzodiazepínicos (BZD) são fármacos amplamente utilizados na prática clínica e não há, até o presente momento, informações sobre a sua influência na eliminação de solventes orgânicos voláteis (SOV), utilizados no ambiente laboral. Dessa maneira, neste trabalho investigamos a influência do diazepam (DZP) na excreção do TOL pela determinação de seus produtos de biotransformação na urina, ácido hipúrico (AH) e *orto*-cresol (*o*-C). Para tal avaliação, ratos machos Wistar ($n = 5$, por grupo), de 250 ± 10 g, foram expostos ao solvente na concentração de 20 ppm em uma câmara de exposição do tipo *nose only exposure system* (6h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas) com simultânea administração de DZP ($10 \text{ mg Kg}^{-1}/\text{dia}$) (GTOL/DZP). Animais submetidos às mesmas condições, porém sem receber DZP (GTOL), assim como um grupo de animais expostos ao ar atmosférico e tratados com DZP ($10 \text{ mg Kg}^{-1}/\text{dia}$) (GDZP), também foram avaliados. O grupo controle (CTRL) foi submetido apenas à exposição ao ar atmosférico. A urina excretada durante as 16 h que sucederam a última exposição foi coletada e armazenada até o momento das análises. Os níveis de *o*-C urinário foram determinados pela técnica de extração líquido-líquido (ELL), seguida pela separação e detecção no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GC-EM), enquanto que através de uma diluição em água ultrapurificada (1:10, v/v) da urina coletada, AH e creatinina (CR) puderam ser determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A coleta de sangue ocorreu após 16 h da última administração de DZP. As concentrações plasmáticas de DZP e seu metabolito, nordiazepam (NOR), foram analisadas por CLAE-DAD com prévio preparo de amostras pela ELL. Todas as metodologias analíticas utilizadas no presente estudo foram satisfatoriamente validadas ($r^2 > 0,99$; precisão e exatidão com coeficiente de variação e erro relativo, respectivamente, inferiores a 15%). Após avaliações estatísticas dos dados foi possível observar que o DZP exerce influência sobre a excreção do *o*-C no grupo GTOL/DZP (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$), comparado ao grupo GTOL. Os resultados obtidos permitem concluir que o uso de DZP

pode influenciar na excreção do TOL através do *o*-C urinário, sendo esta informação relevante no monitoramento biológico desse solvente.

Palavras-chave: Exposição ao Tolueno. Diazepam. Exposição ocupacional. Orto-cresol urinário. Ácido Hipúrico urinário.

ABSTRACT

Toluene (TOL) is an aromatic hydrocarbon widely used in glues, paints, detergents, dyes, gasoline, thinners and pharmaceuticals. Human exposure to TOL occurs through inhalation or skin contact, in the workplace, or as a drug of abuse. It has been reported that some drugs, such as ethanol and phenobarbital, can influence the kinetics of TOL metabolism due the interactions on cytochrome P450 (CYP) isozymes. Benzodiazepines (BZD) are drugs widely used and there is no information on the influence of this class of drugs on the eliminations of volatile organic solvents (VOS) in the labor environment. So, in the present study, we investigated the influence of diazepam (DZP) on the excretion of TOL by determination of their metabolites, hippuric acid (HA) and ortho-cresol (*o*-C). Male Wistar rats ($n = 5$ per group), 250 ± 10 g, were exposed to TOL at a concentration of 20 ppm in a nose-only exposure chamber (6h/day, 5 day/week, for 6 weeks) with simultaneous administration of DZP ($10 \text{ mg Kg}^{-1}/\text{day}$) (GTOL/DZP). A group treated under the same condition, but without DZP (GTOL), and a group exposed to air and treated with DZP ($10 \text{ mg Kg}^{-1}/\text{day}$) (GDZP) were executed. The control group (CTRL) was exposed to air only. The urine excreted during the 16 h after the last exposure was collected and stored until the analysis. The urinary *o*-C levels were determined by liquid-liquid extraction (LLE), followed by separation and detection in a gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS), while, with a simple dilution of the collected urine in ultrapure water (1:10, v/v), HA and creatinine (CR) could be determined by high-performance liquid chromatography coupled to the photodiode array detector (HPLC-DAD). Blood collection occurred after 16 hours of the last administration of DZP. The plasma concentrations of DZP and its metabolite, nordiazepam (NOR), were analyzed by HPLC-DAD with prior sample preparation by LLE. All analytical methods used in this study were satisfactorily validated ($r^2 > 0.99$; accuracy and precision with relative standard deviation and relative error, respectively, less than 15%). After statistical processing of data it was possible to observe that there is influence of DZP on the excretion of *o*-C ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) on the GTOL/DZP group, when compared to the GTOL group. The results permitted to conclude that the use of DZP seems to influence the excretion of TOL through the urinary *o*-C and this is a relevant information to be used in the biological monitoring of this solvent.

Key words: Toluene exposure. Diazepam. Occupational exposure. Urinary ortho-cresol.
Urinary hippuric acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do TOL.	23
Figura 2 - Biotransformação do TOL.	25
Figura 3 - Estrutura química representativa dos BZD.	27
Figura 4 - Biotransformação do DZP.	28
Figura 5 - Câmara de exposição do tipo NOES.	48
Figura 6 - Contentores de acrílico.	48
Figura 7 - Sistema de infusão de solvente.	49
Figura 8 - Amostragem da atmosfera experimental.	50
Figura 9 - Espectro de massas do <i>o</i> -C na concentração de 5,0 mg L ⁻¹ em metanol.	53
Figura 10 - Cromatograma do <i>pool</i> de urina de ratos não expostos.	54
Figura 11 - Soluções padrão de <i>o</i> -C, <i>o</i> -Cd ₈ e <i>m</i> -C.	54
Figura 12 - Cromatograma de urina (<i>pool</i>) fortificada com <i>o</i> -C na concentração de 0,6 mg L ⁻¹	55
Figura 13 - Curva analítica do <i>o</i> -C.	56
Figura 14 - Avaliação do efeito residual na metodologia de determinação de <i>o</i> -C em urina.	56
Figura 15 - Curva analítica do AH.	60
Figura 16 - Curva analítica da CR.	61
Figura 17 - Cromatograma do <i>pool</i> de urina de animais não expostos ocupacionalmente ao TOL.	61
Figura 18 - Cromatograma de amostra de urina fortificada com AH e CR, ambos na concentração de 1750 mg L ⁻¹	62
Figura 19 - Cromatograma de amostra de urina fortificada com AH e CR, ambos na concentração de 250 mg L ⁻¹ (LIQ).	64
Figura 20 - Curva analítica do DZP.	66
Figura 21 - Curva analítica do NOR.	66
Figura 22 - Cromatograma do <i>pool</i> de plasma com ausência de interferentes nas regiões de eluição dos analitos.	68
Figura 23 - Cromatograma de amostra de plasma fortificado com NOR e DZP, ambos na concentração de 600 µg L ⁻¹ e NIT, na concentração de 2500 µg L ⁻¹	68

- Figura 24** - Cromatograma de solução padrão contendo NOR e DZP, na concentração de 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de metanol e NIT, na concentração de 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ 68
- Figura 25** - Cromatograma de amostra de plasma fortificado com NOR e DZP, ambos na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LIQ) e NIT, na concentração de 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Levantamento de metodologias para quantificação dos analitos pesquisados.	32
Tabela 2 - Planejamento experimental para a verificação da interferência do DZP em bioindicadores de dose interna do TOL em ratos.	46
Tabela 3 - Resultados da linearidade do método de determinação de <i>o</i> -C em urina.	55
Tabela 4 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de <i>o</i> -C em urina: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.	57
Tabela 5 - Resultados da linearidade do método de determinação de AH e CR em urina.	60
Tabela 6 - Estudos de estabilidade de soluções padrão de AH e CR em urina.	62
Tabela 7 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de AH e CR em urina: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.	63
Tabela 8 - Resultados da linearidade do método de determinação de NOR e DZP em plasma.	65
Tabela 9 - Estudos de estabilidade de soluções padrão de NOR e DZP em plasma.	67
Tabela 10 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de NOR e DZP em plasma: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.	69
Tabela 11 - Resultados da análise das concentrações de TOL nas portas da câmara de exposição.	71
Tabela 12 - Resultados das determinações dos bioindicadores de exposição ao TOL e das concentrações plasmáticas de DZP e NOR em ratos.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACGIH	- <i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
AH	-Ácido Hipúrico
BEI	- <i>Biological Exposure Indices</i>
BI	-Bioindicador
BZD	-Benzodiazepínicos
CC	-Estabilidade após ciclos de congelamento
CEBRID	-Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas
CG	-Cromatografia Gasosa
CG-EM	-Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	-Cromatografia líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
CR	-Creatinina
CTRL	-Grupo controle
CYP	-Citocromo P450
DAD	-Arranjo de diodos
DZP	-Diazepam
ECC	- <i>European Economy Community</i>
ELL	-Extração Líquido-Líquido
EM	-Espectrometria de Massas
EP	-Erro padrão da média
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FID	-Detector de Ionização em Chama
GABA	-Ácido gama-aminobutírico
GDZP	-Grupos exposto ao diazepam
GTOL	-Grupo exposto ao tolueno
GTOL/DZP	-Grupo exposto ao tolueno e ao diazepam
IC 95%	-Intervalo de confiança de 95%
IE	-Impacto de Elétrons
LATF	-Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos
LD	-Estabilidade de longa duração

LIQ	-Limite inferior de quantificação
m-C	- <i>meta</i> -cresol
ND	-Não detectado
NIOSH	- <i>National Institute for Occupational Health and Safety</i>
NIT	-Nitrazepam
NOES	- <i>Nose Only Exposure System</i>
NOR	-Nordiazepam
NR-7	-Norma Regulamentadora nº7
o-C	- <i>orto</i> -cresol
o-Cds	- <i>orto</i> -cresol deuterado
OSHA	- <i>Occupational Safety and Health Administration</i>
OZP	-Oxazepam
p. ex.	-por exemplo
p-C	- <i>para</i> -cresol
PI	-Padrão Interno
PP	-Estabilidade pós-processamento
PTFE	-Politetrafluoretileno (Teflon®)
PVDF	-Fluoreto de Polivinilideno
SE	-Solução Estoque
SI	-Solução Padrão Intermediária
SIM	- <i>Selected Ion Monitoring</i>
SOV	-Solventes orgânicos voláteis
SPE	-Extração em Fase Sólida
SPME-HS	-Microextração em fase sólida - <i>Head Space</i>
ST	-Solução de Trabalho
TLV-TWA	- <i>Threshold Limit Value - Time Weighted Average</i>
TOL	-Tolueno
TR	-Tempo de Retenção
TZP	-Temazepam
UV	-Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-Porcentagem
°C	-Grau Celsius
µg	-Micrograma
µL	-Microlitro
µm	-Micrômetro
<i>a</i>	-Inclinação
<i>b</i>	-Intercepto
cm	-Centímetro
CV%	-Coeficiente de Variação
E%	-Erro Relativo
eV	-Elétron-volt
g	-Gramma
<i>g</i>	-Gravidade (força centrífuga relativa)
h	-Hora
Kg	-Quilograma
L	-Litro
log $P_{O/A}$	-Coeficiente de partição óleo/água
M	-Massa Molar
m	-Metro
m/v	-Razão massa por volume
<i>m/z</i>	-Razão massa carga
m³	-Metro cúbico
mg	-Miligrama
min	-Minuto(s)
mL	-Mililitro
mm	-Milímetro
mmHg	-Milímetro de mercúrio
mmol	-Milimol
n	-Número de amostras ou replicatas
nm	-Nanômetro
pH	-Potencial Hidrogeniônico

- ppm** -Parte por milhão
- R%** -Percentual de Recuperação
- r²** -Coeficiente de Determinação
- v/v** -Razão volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	SOLVENTES ORGÂNICOS VOLÁTEIS	21
2.1.1	Tolueno	22
2.2	BENZODIAZEPÍNICOS.....	26
2.2.1	Diazepam	27
2.3	FATORES QUE INFLUENCIAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO DO TOLUENO.....	29
2.4	MÉTODOS BIOANALÍTICOS	30
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	35
4.1.1	Equipamentos Gerais	35
4.1.2	Análise de <i>orto</i>-cresol em urina por CG-EM	35
4.1.2.1	Reagentes e soluções.....	36
4.1.2.2	Parâmetros analíticos	36
4.1.2.3	Preparo da amostra.....	37
4.1.3	Análise de ácido hipúrico e creatinina em urina por CLAE-DAD	38
4.1.3.1	Reagentes e soluções.....	38
4.1.3.2	Parâmetros analíticos	39
4.1.3.3	Preparo da amostra.....	39
4.1.4	Análise de diazepam e nordiazepam em plasma por CLAE-DAD	40
4.1.4.1	Reagentes e soluções.....	40
4.1.4.2	Parâmetros analíticos	41

4.1.4.3	Preparo da amostra.....	41
4.1.5	Validação Analítica	42
4.1.5.1	Linearidade.....	42
4.1.5.2	Seletividade.....	42
4.1.5.3	Limite de quantificação.....	43
4.1.5.4	Precisão e Exatidão	43
4.1.5.5	Efeito residual	44
4.1.5.6	Recuperação	44
4.1.5.7	Estabilidade.....	44
4.2	AMOSTRAGEM	45
4.2.1	Animais	45
4.2.2	Protocolo Experimental	45
4.2.3	Câmara de exposição	47
4.2.3.1	Validação da câmara para tolueno	49
4.3	CORRELAÇÃO E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	METODOLOGIAS ANALÍTICAS	52
5.1.1	Análise de <i>orto</i>-cresol em urina por CG-EM	52
5.1.2	Análise de ácido hipúrico e creatinina em urina por CLAE-DAD	59
5.1.3	Análise de diazepam e nordiazepam em plasma por CLAE-DAD	65
5.2	CÂMARA DE EXPOSIÇÃO	71
5.3	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO AO TOLUENO	72
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO	86
	APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

Na Toxicologia Ocupacional o maior objetivo é a prevenção de alterações da saúde dos trabalhadores expostos a fatores de risco diversos. Fatores estes, como a exposição a agentes químicos, impõem que a avaliação dos xenobióticos no ambiente de trabalho seja sistemática. As medidas preventivas destinadas a esse fim são conhecidas como monitoramento ambiental e biológico (DELLA ROSA et al. 2014).

A avaliação da exposição, pela determinação do xenobiótico e de seu(s) produto(s) de biotransformação no organismo, é realizada pelo monitoramento biológico. Através deste, a avaliação da magnitude das interações entre um sistema biológico e o agente ambiental pode ser obtida por medições específicas, denominadas bioindicadores (BI) que, pela comparação dos seus níveis com valores de referência, pode ser usada na avaliação do risco à saúde (JAKUBOWSKI; TRZCINKA-OCHOCKA, 2005; DELLA ROSA et al. 2014).

Os fatores que afetam o monitoramento biológico, desde a escolha da amostra até a interpretação dos resultados da análise toxicológica, precisam ser conhecidos para que seus dados sejam adequadamente interpretados e utilizados na proteção da saúde do trabalhador. Para os solventes, o risco tóxico advindo de seu uso é bastante variável, em função de suas propriedades físico-químicas e de fatores diversos que podem alterar as fases de exposição, toxicocinética e toxicodinâmica dos mesmos (ALVAREZ-LEITE, 2014).

Embora existam poucos estudos na literatura, a atenção aos efeitos da interação entre a exposição aos solventes orgânicos e o uso de fármacos tem aumentado. Estudos demonstram que a clorzoxazona, fármaco relaxante muscular, é um substrato seletivo para CYP2E1, isoforma que participa na biotransformação do tolueno (TOL) (MENDOZA-CANTÚ et al. 2006). No estudo conduzido por Mateus et al. (2008), foi avaliada a influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo do verapamil (composto quiral da classe dos antiarrítmicos, comercializado como mistura racêmica de seus enantiômeros) e os resultados demonstraram que quando ratos eram expostos em concentrações iguais ou acima dos limites ambientais aceitáveis, para os solventes estudados, uma perda da enantiosseletividade na disposição cinética desse fármaco era observada, porém a atividade enzimática envolvida no metabolismo de ambos os enantiômeros se mantiveram normais.

Dentre os compostos orgânicos voláteis, o TOL merece especial atenção, pois é um solvente amplamente utilizado nas indústrias químicas. As principais fontes de exposição ocupacional decorrem de seu uso como solvente para óleos, borracha natural e sintética, resinas

e carvão. É utilizado também como diluente de tintas e vernizes, é constituinte, juntamente com o n-hexano, da cola de sapateiro e é matéria-prima para a síntese de vários compostos, tais como benzoatos, sacarina, trinitrotolueno, entre outros (MENDOZA-CANTÚ et al. 2006).

Apesar dos benzodiazepínicos (BZD) estarem entre os fármacos mais consumidos atualmente, os dados sobre sua interação na biotransformação de compostos orgânicos voláteis são escassos ou inexistentes. De acordo com o levantamento realizado pelo Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), em 2005, a prevalência de uso dos BZD na população brasileira foi de 5,6%, sendo a faixa etária igual ou acima de 35 anos aquela com maior incidência de uso (CEBRID, 2006).

Assim como os demais BZD, o diazepam (DZP) é um fármaco largamente utilizado para aliviar tensão, ansiedade, espasmos musculares e controlar estados epiléticos. Tais aplicações clínicas se devem às suas propriedades hipnótica, tranquilizante, antidepressiva, sedativa e como relaxante muscular (FREIRE et al. 2005).

Embora ambos, TOL e DZP, serem metabolizados pelo sistema citocromo P450 (CYP), algumas isoenzimas deste sistema são comuns na biotransformação das duas substâncias. Porém, pouco se sabe sobre a interação de fármacos na farmacocinética de solventes e as implicações na avaliação da exposição ocupacional. Desse modo, levando-se em consideração a alta frequência do uso de BZP na prática clínica e a grande quantidade de trabalhadores expostos aos solventes, este estudo teve como objetivo avaliar a interferência do DZP nos níveis urinários do ácido hipúrico (AH) e do *orto*-cresol (*o*-C), que são produtos de biotransformação do TOL preconizados como bioindicadores de dose interna no monitoramento da exposição ocupacional ao solvente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A exposição às substâncias químicas no ambiente de trabalho, ou fora dele, pode provocar alterações do estado de saúde das pessoas que trabalham e vivem nesses respectivos ambientes. Essas alterações podem ser prevenidas com medidas que incluem a substituição do agente químico responsável pelo efeito tóxico, sendo que isso nem sempre é possível. Dessa maneira, faz-se necessário reduzir a exposição aos xenobióticos de tal forma que limite a probabilidade do aparecimento do efeito nocivo, tornando-se fundamental o monitoramento da exposição (DELLA ROSA et al. 2014).

No monitoramento da exposição ocupacional podem ser utilizados parâmetros ambientais (Monitoramento Ambiental) ou biológicos (Monitoramento Biológico ou Biomonitoramento), os quais são, fundamentalmente, com finalidade preventiva. Segundo Della Rosa et al. (2014), o monitoramento ambiental é a determinação dos agentes presentes no ambiente de trabalho para avaliar o risco à saúde, sendo os dados obtidos comparados com referências apropriadas.

O biomonitoramento é a avaliação da exposição humana a alguns agentes químicos determinando o composto inalterado ou seus produtos de biotransformação em tecidos, secreções, urina e ar expirado dos indivíduos expostos. Os níveis de xenobióticos encontrados refletem a quantidade de tais substâncias que realmente foram absorvidas através do ambiente de exposição, sendo assim é possível avaliar o risco à saúde quando comparados com referências apropriadas (BERLIN; YODAIKEN; LOGAN, 1982; RÍOS B.; SOLARI G., 2010; DELLA ROSA et al. 2014).

No monitoramento biológico deve-se conhecer um parâmetro biológico que se possa correlacionar com a exposição ou com a eventual ação do xenobiótico no organismo. Tal parâmetro biológico, denominado bioindicador, marcador biológico ou ainda indicador biológico, no contexto da Toxicologia Ocupacional, foi definido por Jakubowski e Trzcinka-Ochocka (2005), como medidas específicas de uma interação entre um sistema biológico e um agente ambiental.

A seleção de um bioindicador tem uma importância crítica, pois representa uma grande oportunidade de precisão na avaliação de risco à saúde, tanto na análise da exposição individual quanto de uma população (IPCS, 1993). Porém, de acordo com Della Rosa et al. (2014), para se empregar um indicador biológico corretamente é necessário considerar múltiplos aspectos,

sobretudo as características toxicocinéticas e toxicodinâmicas do xenobiótico, em razão do elevado número de substâncias de uso industrial comum.

Os níveis dos indicadores biológicos detectados em trabalhadores expostos a determinado toxicante são avaliados frente a dois tipos de valores: os valores de referência e os valores limites biológicos de exposição (AITIO, 1994). Os valores de referência, que são os níveis de um indicador determinado numa população cuja característica principal é a de não estar exposta à substância química considerada, são quesitos indispensáveis ao monitoramento biológico, pois permitem o estabelecimento de estratégias de controle. Já, os valores limites biológicos de exposição devem ser vistos como níveis de advertência, propostos com base no conhecimento da relação dose/resposta e não como valores que separam exposições seguras de exposições perigosas (BRASIL, 1994).

Diversas são as entidades e pesquisadores que têm se preocupado com o estabelecimento desses limites que, no Brasil, constituem norma legal desde 1983. Deve-se ter sempre presente que as avaliações periódicas do estado de saúde nunca permitirão prevenir intoxicações agudas, resultantes de uma intensa exposição repentina. Esses exames só servem para prevenir os efeitos adversos produzidos por uma exposição crônica (BRASIL, 1995; DELLA ROSA et al. 2014).

Para o biomonitoramento, as amostras mais utilizadas são sangue e urina, em função da facilidade da obtenção e das informações obtidas com os resultados das análises, uma vez que, além de demonstrarem a exposição, alguns indicadores permitem também, verificar alterações biológicas precoces advindas da exposição ao(s) xenobiótico(s). A avaliação da absorção, em seguida à uma exposição, é realizada através dos chamados indicadores de dose interna (biomarcador de exposição). Já as avaliações dos efeitos precoces são efetuadas através dos indicadores de efeito (biomarcador de efeito), os quais são capazes de evidenciar as alterações reversíveis que ocorrem no órgão crítico. Existem ainda, os indicadores de suscetibilidade, os quais estão relacionados às características congênitas ou adquiridas de cada indivíduo que, de alguma forma, podem influenciar na maneira como o organismo reage em situações de exposição aos xenobióticos. O monitoramento, ambiental e biológico e, além desses, a vigilância da saúde, são atividades complementares destinadas a um único objetivo: a prevenção de doenças produzidas pela exposição ocupacional a agentes químicos (JAKUBOWSKI; TRZCINKA-OCHOCKA, 2005; DELLA ROSA et al. 2014).

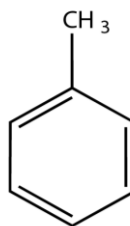
2.1 SOLVENTES ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Uma classe de substâncias químicas que representa significativo risco à saúde do trabalhador é a dos solventes orgânicos voláteis (SOV), devido à sua larga utilização em vários ambientes laborais (indústrias, meio rural, laboratórios químicos etc.) e em produtos industriais como colas, tintas, plásticos, adesivos, artigos têxteis, solventes, agentes removedores, combustíveis, ceras, produtos agrícolas, além de produtos de uso doméstico, como os agentes de limpeza. Esses compostos apresentam características semelhantes quanto aos aspectos toxicológicos e físico-químicos. Atravessam a barreira hematoencefálica com facilidade; alcançam facilmente a corrente sanguínea, após difusão nos pulmões; apresentam efeito aditivo quando na exposição múltipla; são, geralmente, líquidos com alta pressão de vapor, inflamáveis, lipofílicos e de odor característico. As vias mais comuns de absorção são a inalatória e dérmica. Quando absorvidos, são distribuídos e podem ser excretados na forma inalterada ou biotransformada ou podem ainda sofrer bioacumulação em tecidos ricos em lipídios, tais como o cérebro e o tecido adiposo (WHITE; PROCTOR, 1997; BRUCKNER; ANAND; WARREN, 2008; ALVAREZ-LEITE, 2014).

A exposição a solventes orgânicos resulta tipicamente em depressão do sistema nervoso central e psicomotor ou déficit de atenção. O paciente pode apresentar queixas de fadiga, irritabilidade, confusão ou depressão, e em alguns casos, dificuldades de memória. Quando a função do sistema nervoso periférico é afetada, o paciente pode sentir um início gradual de sintomas, como formigamento e dormência intermitente, progredindo para uma diminuição da sensibilidade e falta de coordenação motora (WHITE; PROCTOR, 1997; BRUCKNER; ANAND; WARREN, 2008; WIN-SHWE; FUJIMAKI, 2010).

2.1.1 Tolueno

Um dos SOV empregados em processos industriais é o TOL (Figura 1), que é um hidrocarboneto aromático volátil, incolor, de odor característico e de significativa lipossolubilidade. Também conhecido como toluol[®], metilbenzeno, fenilmetano e metacide[®], o TOL ($C_6H_5CH_3$, $M = 92,14 \text{ g mol}^{-1}$) apresenta como ponto de ebulição, densidade, pressão de vapor e coeficiente de partição ($\log P_{O/A}$) os seguintes valores: 110,6 °C, 0,867 g mL⁻¹ (a 20 °C), 28,4 mmHg (a 25 °C) e 2,72, respectivamente. Para converter a concentração de TOL de ppm para mg m⁻³, ou o oposto, pode-se utilizar os fatores de conversão a seguir: 1 ppm = 3,77 mg m⁻³; 1 mg m⁻³ = 0,265 ppm (25 °C, 760 mmHg) (EPA, 2005).

Figura 1 - Estrutura química do TOL.

Fonte: Do Autor.

Esse solvente pode ser encontrado na gasolina, em muitas tintas, colas, polidores, diluentes, desengordurantes e removedores, além de ser usado na produção de nylon, plásticos e poliuretano (GONZALEZ et al. 2010; ALVAREZ-LEITE, 2014). Tais produtos e processos industriais representam uma importante fonte de exposição ao TOL, seja por inalação de seus vapores dispersos no ambiente ou pelo contato direto do líquido com a pele (SANTOS, 2001).

Cerca de 40 a 60% da fração de TOL inalado é absorvido pela via pulmonar, sendo essa considerada a principal via de exposição. A quantidade absorvida é dependente de fatores como a concentração no ar inalado, extensão da exposição, ventilação pulmonar, gradiente de concentração no espaço alveolar, coeficiente de distribuição sangue/ar e, em menor magnitude, da circulação através dos alvéolos. Independentemente da quantidade inalada de TOL, decorridos 10 a 15 min de exposição, sua concentração no ar alveolar e no sangue arterial eleva-se de forma rápida, após esse período, a elevação passa a ser lenta estabilizando-se por volta de 25 min. A retenção pulmonar varia de acordo com o tempo, sendo de 75-80% nos primeiros 30 min e de 40-50% após 2-3 h de exposição (SANTOS, 2001; EPA, 2005; ALVAREZ-LEITE, 2014).

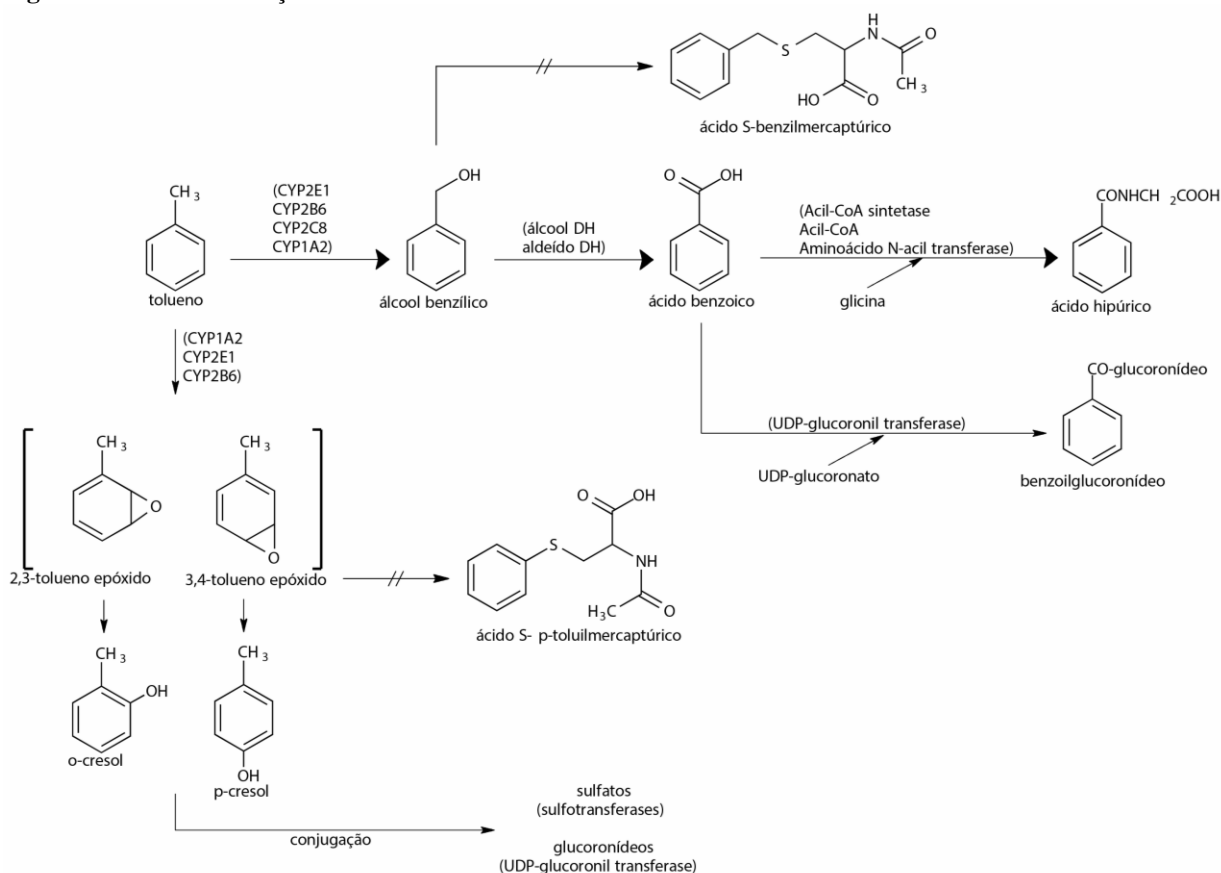
A segunda via potencial de exposição é a derme e sua taxa de absorção varia de 14 a 23 mg cm⁻²/h, podendo ocorrer ressecamento e irritação da pele. Em casos de ingestão acidental ou em tentativas de suicídio, estudos demonstraram que a absorção de TOL pelo trato gastrointestinal é da ordem de 100% (EPA, 2005).

Do TOL absorvido, aproximadamente 80% é biotransformado na fração microsomal hepática em vários produtos, conforme pode ser observado na Figura 2. A principal via de biotransformação é a hidroxilação do grupamento metila (acima de 90%), formando o álcool benzílico, processo este mediado pelo sistema citocromo P450. O álcool benzílico é então oxidado pela álcool-desidrogenase e aldeído-desidrogenase a ácido benzoico. Através da conjugação deste ácido com a glicina ocorre a formação do AH, já a conjugação com o ácido glicurônico, mas em menor proporção, resulta na produção de benzoilglucoronídeos. Em uma via secundária da metabolização do TOL, também mediada pelo CYP, estudos realizados na

década de 1990, destacaram que por meio da oxidação do anel aromático presente no TOL origina-se epóxidos intermediários (2,3-tolueno epóxido e 3,4-tolueno epóxido) e esses, culminam a *orto*- e *para*-cresol (*o*-C e *p*-C), que são, sob o ponto de vista quantitativo, menos importantes que o AH (menos de 1% do TOL absorvido sofrerá biotransformação por essa via). Por uma variedade de reações de conjugação, os cresóis podem ser eliminados principalmente na forma de sulfatos e glucoronídeos (IARC, 1999; EPA, 2005; ALVAREZ-LEITE, 2014).

Estudos realizados em fígado de ratos demonstraram que as isoenzimas CYP2E1 e CYP2C11/6 são as principais responsáveis por catalisar os passos iniciais de hidroxilação em baixas e altas concentrações de TOL, respectivamente. As isoenzimas CYP2B1/2, CYP2C11/6 e CYP2E1 contribuem para a formação de álcool benzílico, enquanto CYP1A1/2, CYP2B1/2 e CYP2C11/6 convertem TOL a *o*-C. O *p*-C é formado através da ação das isoenzimas CYP2B1/2, CYP2C11/6, CYP2E1 e CYP1A1/2. Já, em humanos, a CYP2E1 (mais ativa em baixas doses) é o principal sistema envolvido na formação do álcool benzílico, seguida pelas isoenzimas CYP2B6, CYP2C8, CYP1A2 e CYP1A1 (em ordem decrescente de atividade). A metabolização de TOL a *p*-C é catalisada pela CYP2B2 e CYP2E1, ao passo que a CYP1A2 catalisa a formação de ambos, *o*- e *p*-C (NAKAJIMA et al. 1997; IARC, 1999; BRUCKNER; ANAND; WARREN, 2008; MATEUS et al. 2008).

Figura 2 - Biotransformação do TOL.



Fonte: Adaptado de EPA (2005).

Notas: Prováveis enzimas envolvidas: desidrogenase (DH), citocromo P-450 (CYP), uridil 5'- difosfato (UDP), coenzima A (CoA).

Após exposição única, praticamente todo o TOL absorvido é excretado entre 18 e 24 horas. Cerca de 7 a 20% do solvente é eliminado na forma inalterada pelo ar expirado, enquanto o restante é excretado na forma de metabólitos na urina. Dos metabólitos excretados, a maior porção é representada pelo AH (31 a 80%), seguido pelos ácidos S-benzilmercaptúrico e S-*p*-toluilmercaptúrico (não mais do que 2%), *p*-C (1%), e, em menor quantidade, *o*-C (0,1%) (ALVAREZ-LEITE, 2014).

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) do Ministério do Trabalho e Emprego, que instituiu o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional, estabelece parâmetros biológicos de exposição ocupacional para alguns agentes químicos. Assim, o valor de referência e o índice biológico máximo permitido, para o AH, IB de exposição adotado para o TOL no país, apesar de suas limitações, são, respectivamente, de 1,5 g g⁻¹ e 2,5 g g⁻¹ de creatinina (CR) (BRASIL, 1994).

A concentração de AH na urina, coletada ao final da jornada de trabalho, correlaciona-se com a exposição média do dia, quando avaliada em trabalhadores expostos. Esta

concentração é influenciada pela dieta (alimentos que contenham ácido benzoico e seus precursores) e pelo uso de medicamentos contendo fármacos tais como isocarboxazida, dietilpropiona, femprobamato e cocaína, os quais podem aumentar a excreção fisiológica de AH na urina (ALVAREZ-LEITE, 2014). O AH é considerado um IB somente em exposições ambientais ao TOL maiores que 30 ppm, sendo o limite de tolerância para o TOL no Brasil igual a 78 ppm (BRASIL, 1995). A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), nos Estados Unidos, propôs em 2010, um *Threshold Limit Value - Time Weighted Average* (TLV-TWA) de 20 ppm de TOL, no ambiente, como o recomendado para prevenir os seus efeitos tóxicos em exposição ocupacional. Esse mesmo órgão internacional adota os *Biological Exposure Indices* (BEI) de 0,02 mg L⁻¹ de TOL em sangue, 0,03 mg L⁻¹ de TOL em urina e 0,3 mg g⁻¹ de CR para a avaliação do IB *o*-C.

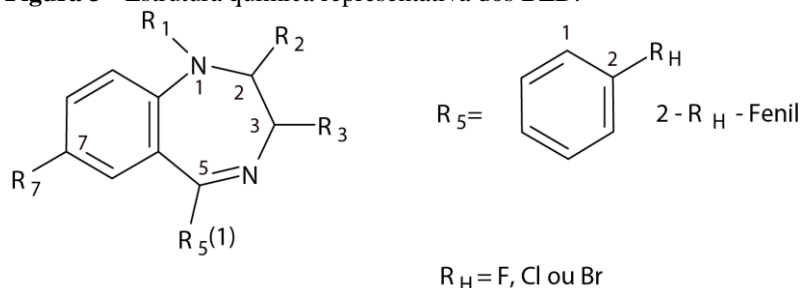
Segundo Alvarez-Leite (2014), o *o*-C urinário não está presente significativamente em pessoas não-fumantes e não-expostas ao solvente. Assim, seus valores basais não são elevados ($\leq 0,3$ mg L⁻¹), o que o torna vantajoso como IB em relação ao AH. Porém, é influenciado pelo hábito de fumar e a sua detecção é dificultada em exposições leves ao solvente. O TOL no sangue apresenta como desvantagem a rápida distribuição do solvente para órgão e tecidos, o que dificulta a amostragem para o monitoramento biológico. Em contrapartida, o TOL na urina (quantidade estimada de 0,005% do total absorvido) vem sendo recomendado como um dos bioindicadores mais adequados para monitorar a exposição ao solvente. Porém, para sua análise o método analítico deve ser adequado, em relação à detectabilidade, que é na ordem de ng L⁻¹, em consequência da baixa excreção urinária do solvente na forma inalterada (BRASIL, 1994; PAIVA; MARTINS; SIQUEIRA, 2007; NETTO et al. 2008; ALVAREZ-LEITE, 2014).

2.2 BENZODIAZEPÍNICOS

Os BZD são fármacos amplamente utilizados pela população de um modo geral por apresentarem propriedades variadas como ansiolíticas, hipnóticas, antidepressivas e anticonvulsivantes (FIRMINO et al. 2012). Nos Estados Unidos, pesquisas demonstraram que 10-15% dos adultos fazem uso de BZD, sendo que 2% desses, utilizam tais fármacos de forma crônica. Já nas cidades de São Paulo e Porto Alegre, essa classe de fármacos apresenta uma prevalência de uso de 10,2% e 21,3%, respectivamente (RIBEIRO et al. 2007).

As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos BZD afetam acentuadamente sua utilidade clínica. São altamente lipofílicos e fracamente básicos, sendo absorvidos, em maior proporção, no duodeno. Dependendo da eletronegatividade e polaridade dos grupamentos constituintes (Figura 3), a lipofilicidade pode variar em até 50 vezes entre os fármacos desta classe (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005; FREIRE et al. 2005).

Figura 3 - Estrutura química representativa dos BZD.



Fonte: Adaptado de Borges et al. (2009).

Os BZD são biotransformados principalmente no fígado, por enzimas do sistema microsomal. Após sofrerem oxidação microssômica, incluindo a *N*-desalquilação e a hidroxilação alifática, os produtos são subsequentemente conjugados, pelas glicuroniltransferases, formando glucoronídeos excretados pela urina. Cabe destacar que muitos desses produtos são ativos e apresentam meia-vida mais longa que o precursor, sendo os principais o nordiazepam (NOR), o temazepam (TZP) e o oxazepam (OZP) (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005; FREIRE et al. 2005).

2.2.1 Diazepam

Um dos representantes mais importantes da classe dos BZD é o DZP, o qual vem sendo largamente utilizado para uma vasta gama de desordens, entre elas, insônia, abstinência de álcool, problemas psiquiátricos, assim como para o alívio da ansiedade (MARINGKA et al. 2011).

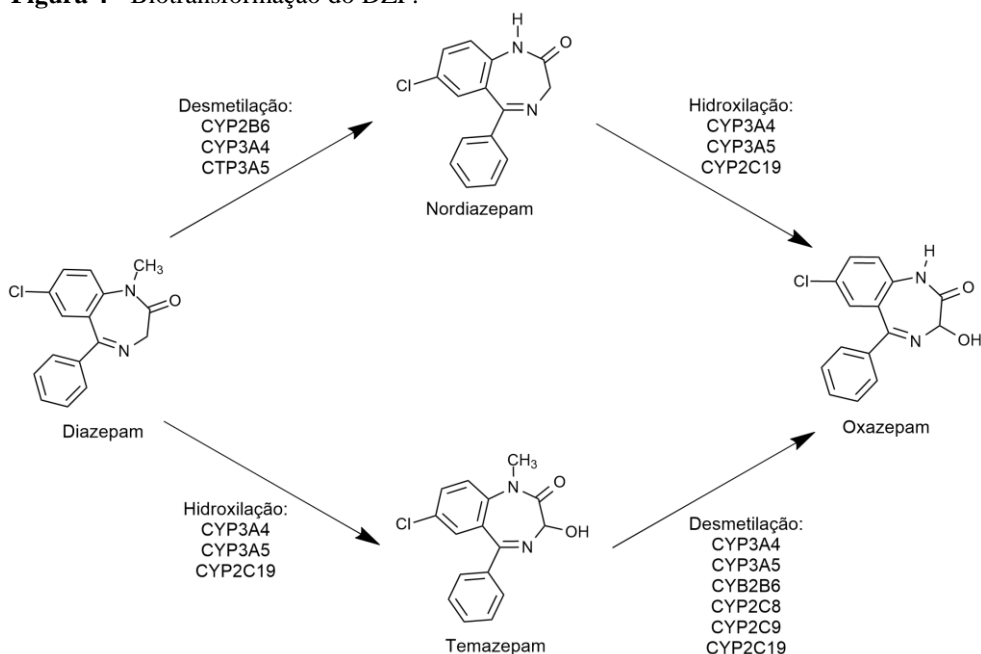
O DZP, conhecido comercialmente como Valium[®], é um fármaco heterocíclico de fórmula molecular igual a C₁₆H₁₃ClN₂O e M = 284,7 g mol⁻¹. Devido sua alta lipossolubilidade (log P_{O/A} = 3,08), uma das mais altas entre os BZP, pode se acumular gradualmente na gordura corporal. É administrado via intravenosa, oral, sublingual, intramuscular ou retal. Quando

administrado por via oral é prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal com uma biodisponibilidade média de 90% (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005; MARTINDALE, 2009).

O DZP, assim como os demais BZP, age de forma seletiva como agonistas nos receptores GABA (ácido gama-aminobutírico), na subunidade GABA_A. Estes receptores medeiam a transmissão sináptica inibitória em todo o sistema nervoso central. O DZP aumenta a ação do GABA pela facilitação da abertura dos canais de cloreto que promovem a hiperpolarização das células nervosas (CHARNEY; MIHIC; HARRIS, 2005).

O DZP é submetido à biotransformação hepática dando origem a uma série de produtos ativos lipofílicos (Figura 4). Após ser predominantemente *N*-desmetilado a NOR pelas CYP2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4 e 3A5 e, em paralelo, mas em menor intensidade, ser C3-hidroxilado a TZP pelas CYP2C19, 3A4 e 3A5, a metabolização do DZP segue com a C3-hidroxilação do NOR via CYP3A4, 3A5 e 2C19 para a formação do metabólito secundário, OZP. Por outro lado, TZP pode ser desmetilado a OZP pelas CYP3A4, 2C19, 3A5, 2C8, 2C9 e 2B6. Em humanos, TZP e OZP sofrem C3-*O*-glicuronidação, gerando produtos terciários (ST-PIERRE; PANG, 1993; YANG et al. 1998; ACIKGÖZ et al. 2009).

Figura 4 - Biotransformação do DZP.



Fonte: Adaptado de Acikgöz et al. (2009).

Com uma meia-vida de eliminação bifásica após administração oral, o DZP apresenta uma fase de distribuição rápida e intensa (meia-vida que pode chegar a 3 h) seguida de uma prolongada fase de eliminação, cerca de 1 a 2 dias. Todavia, seus efeitos podem perdurar de 2-

5 dias devido à formação de metabólitos ativos (p. ex.: NOR). A meia-vida de eliminação terminal do metabólito ativo NOR é de, aproximadamente, 100 h, dependendo da idade e da função hepática. O DZP e seus metabólitos são eliminados principalmente pela urina (cerca de 70%) a uma depuração renal (*clearance*) de 20-30 mL min⁻¹, predominantemente sob a forma de conjugados (MARTINDALE, 2009; FDA, 2015).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO DO TOLUENO

Na literatura, são encontrados trabalhos que avaliam as interações de compostos orgânicos voláteis no metabolismo de fármacos, presentes em medicamentos. Porém, são escassos os dados da influência desses fármacos sobre a eliminação - biotransformação e excreção - dos compostos aos quais os indivíduos estão expostos ocupacionalmente.

A biotransformação do TOL é bastante influenciada por vários fatores, tais como a alimentação, o ritmo circadiano (menor atividade enzimática no período escuro do ciclo, ou seja, durante a noite), o tabagismo e a interação com outras substâncias químicas (ALESSIO; APOSTOLI; CRIPPA, 1995).

Em estudos experimentais, foi demonstrado que a administração de fenobarbital, em ratos, é capaz de induzir a biotransformação do TOL, o que resulta em menor concentração sanguínea da forma inalterada com, conseqüentemente, maior formação de ácido benzoico, resultado da propriedade indutora do fármaco sobre a CYP2B (WANG; NAKAJIMA, 1991).

Vários trabalhos demonstraram que o etanol também pode atuar na inibição ou indução do metabolismo de SOV, quando ingerido em altas e baixas doses, respectivamente. No estudo conduzido por Wang e Nakajima (1991), quando ratos expostos ao TOL foram tratados com baixas concentrações de etanol, este apresentou propriedades indutivas sobre o metabolismo do TOL. Já em Døssing et al. (1984), após voluntários sadios serem expostos ao TOL (100 ppm), durante 7 h por 4 dias, e terem ingerido altas doses de etanol, os resultados indicaram uma inibição da biotransformação do TOL com aumento do TOL alveolar e redução dos níveis de seus metabólitos (AH e *o*-C). No mesmo estudo, os fármacos propranolol e cimetidina, conhecidos inibidores das enzimas microsossomais, também foram avaliados, mas nenhum deles afetou significativamente o metabolismo do TOL.

Analgésicos como o paracetamol e o ácido acetilsalicílico, amplamente utilizados pela população de um modo geral e por trabalhadores, para remediar sintomas de exposições a SOV (p. ex., dor de cabeça), foram avaliados quanto aos seus efeitos na metabolização do TOL em um experimento envolvendo voluntários expostos TOL (80 ppm por 4 h). Após a administração de paracetamol e ácido acetilsalicílico, a concentração sanguínea de TOL aumentou, quando comparada com o grupo controle. Contudo, a quantidade excretada de AH manteve-se constante (LÖF; WALLÉN; HJELM, 1990; ALESSIO; APOSTOLI; CRIPPA, 1995).

Assim como o etanol e o paracetamol, a clorzoxazona também é biotransformada pela CYP2E1. A clorzoxazona é um potente relaxante muscular de ação central com efetiva atividade em espasmos musculares, sendo também utilizada como indicador de atividade da CYP2E1, uma vez que estudos demonstraram que a metabolização da clorzoxazona a 6-hidroxiclorzoxazona, seu principal metabólito, é mediada predominantemente por essa isoenzima (PETER et al. 1990; MCCARVER et al. 1998; MIZUNO et al. 2000). Em Ernstgård et al. (1999), foi avaliada a interação toxicocinética entre o TOL e a clorzoxazona em voluntários masculinos e, apesar de um atraso na excreção do AH, nenhum efeito significativo sobre a cinética de eliminação do TOL foi constatado. Ainda neste estudo, houve um pequeno aumento na concentração plasmática da clorzoxazona após a exposição ao solvente, resultado confirmado pelo estudo de Mizuno et al. (2000), que sugeriu como possível explicação a competição pela CYP2E1 exercida pelos SOV sobre a clorzoxazona *in vivo*.

2.4 MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Para fins de monitoramento, a quantificação de substâncias químicas de interesse em matrizes biológicas é a maneira mais usual para mensurar a influência destas no organismo. Dentre os fluídos biológicos mais utilizados para dosagens de xenobióticos e seus metabólitos estão o sangue total, o plasma, o soro e a urina. Em decorrência da complexidade de tais matrizes e a necessidade de reduzir os limites de detecção, o preparo de amostras se tornou uma etapa de grande importância nos procedimentos analíticos permitindo que as matrizes reais se convertam a amostras adequadas para serem separadas por cromatografia ou outras técnicas analíticas (SMITH, 2003; CHEN et al. 2008).

Com as tradicionais técnicas de preparo de amostras, tais como a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (ELL), questões relacionadas à detectabilidade e ao efeito de

matriz, exercido pelos componentes da amostra, foram contornados através da pré-concentração dos analitos e remoção dos interferentes, respectivamente. Apesar da ELL ter sido uma das primeiras técnicas de preparo de amostras, ainda é muito utilizada devido à facilidade de execução e ao baixo custo. Essa técnica baseia-se no sequestro dos analitos presentes na matriz biológica através de uma fase extratora pelo princípio de partição. Para tanto as duas fases, matriz e fase extratora, devem ser imiscíveis entre si e o analito, no momento da extração, deve apresentar características físico-químicas que o possibilite migrar entre as fases. Dentre as desvantagens da ELL podemos citar a possibilidade de formar emulsão e a grande quantidade de solvente utilizado que, na maioria dos casos, apresentam alta toxicidade e podem contaminar o ambiente (CHEN et al. 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Em um método bioanalítico existem cinco passos primordiais para a determinação de um analito: amostragem, preparo da amostra, separação, detecção e análises dos dados. Como técnica de separação, durante anos a cromatografia vem sendo utilizada com êxito nos laboratórios analíticos (CHEN et al. 2008). Segundo Collins (2006), a cromatografia constitui-se em um processo de separação dos componentes de uma mistura baseado em propriedades físico-químicas, realizada através da distribuição desses componentes em uma fase estacionária e uma fase móvel. Migrações diferenciais dos analitos ocorrem quando estes são distribuídos pelas duas fases através da passagem da fase móvel, sobre a fase estacionária, ocorrendo assim retenções seletivas nesta fase.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) são as técnicas mais utilizadas atualmente. A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega uma fase estacionária (empacotada) muito finamente dividida e uma fase móvel líquida, eluída sob pressão (centenas de libras por polegada quadrada). Nesse tipo de separação, os detectores mais amplamente empregados são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível, podendo ser fotométricos, espectrofotométricos (região ultravioleta e visível) ou por arranjos lineares de fotodiodos (DAD) (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; SKOOG et al. 2006).

Na CG, a separação dos componentes de uma amostra vaporizada ocorre devido a sua partição entre uma fase líquida ou sólida, contida dentro de uma coluna, e uma fase móvel gasosa. Os analitos (voláteis) são carregados pela coluna por um fluxo de gás inerte (fase móvel) e, através do uso de temperaturas convenientes, estas substâncias podem ser retidas por tempos determinados chegando à saída da coluna em tempos diferentes. Após a eluição das substâncias presentes na amostra, estas atingem o sistema de detecção. Atualmente vários detectores são utilizados em CG nas determinações quantitativas, como por exemplo, pode-se citar os

detectores por condutividade térmica, ionização em chama, captura de elétrons e espectrometria de massas (EM) (BONATO, 2006; SKOOG et al. 2006b).

O acoplamento da EM à CG é relativamente simples, uma vez que o funcionamento do CG é suficientemente compatível com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que as ioniza. Esta ionização, podendo ser por impacto de elétrons (IE), consiste no bombardeio das moléculas por elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). Então, os íons passam para o analisador no qual são separados de acordo com a suas razões massa/carga (m/z). A seguir, os íons separados atingem um detector de íons (p. ex., o multiplicador de elétrons) no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado graficamente pelo sistema receptor de dados (BONATO, 2006; SKOOG et al, 2006b; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A Tabela 1 sumariza alguns parâmetros das metodologias bioanalíticas descritas na literatura para quantificação dos analitos em amostras biológicas pesquisados no presente estudo.

Tabela 1 - Levantamento de metodologias para quantificação dos analitos pesquisados.

Analito	Matriz	Extração	Análise	Intervalo	Referências
AH	urina	ELL	CLAE- UV	0,09 - 3,0 mg mL ⁻¹	SILVA et al. 2002
AH/CR	urina	diluição 1:10, v/v	CLAE- DAD	AH: 250 - 3000 µg mL ⁻¹ CR: 20 - 800 µg mL ⁻¹	ANTUNES; PATUZZI; LINDEN, 2008
AH	urina	diluição 1:10, v/v	CLAE- UV	0,01 - 0,21 g L ⁻¹	BULCÃO et al. 2008
DZP/NOR	plasma	ELL e SPE	CLAE- UV	50 - 1200 ng mL ⁻¹	FREIRE et al. 2005
BZD	plasma	ELL e SPE	CLAE- UV	50 - 1200 ng mL ⁻¹	BORGES et al. 2009
<i>o</i> -C	urina	SPME-HS	CG-EM	0 - 5 mg L ⁻¹	FUSTINONI et al. 2005
<i>o</i> -C	urina	SPME-HS	CG- FID	0,1 - 1,5 mg L ⁻¹	PAIVA; MARTINS; SIQUEIRA, 2007

(continua)

Tabela 1 - Levantamento de metodologias para quantificação dos analitos pesquisados.

					(conclusão)
Analito	Matriz	Extração	Análise	Intervalo	Referências
<i>o</i> -C	urina	ELL	CG-EM	0,1 - 15 mg L ⁻¹	COSNIER et al. 2013

Notas: AH - ácido hipúrico; CR - creatinina; DZP - diazepam; NOR - nordiazepam; BZD - benzodiazepínico; *o*-C - orto-cresol; ELL - extração líquido-líquido; SPE - extração em fase sólida; SPME-HS - microextração em fase sólida e *head-space*; CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência; UV - ultravioleta; DAD - arranjo de diodos; CG - cromatografia gasosa; FID - detector de ionização em chamas; EM - espectrômetro de massas.

3 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram divididos em um objetivo geral, apresentando um caráter mais amplo e em objetivos específicos, demonstrados de forma mais detalhada.

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência do uso de diazepam nos níveis dos indicadores biológicos de exposição ao tolueno, *orto*-cresol e ácido hipúrico, por meio da determinação desses produtos de biotransformação na urina de ratos expostos, concomitantemente, ao benzodiazepínico e ao solvente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para se atingir o objetivo proposto, mais especificamente, esse estudo visou:

- a) validar método analítico para a determinação urinária de *orto*-cresol por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), com prévio preparo de amostras por ELL;
- b) validar parcialmente método analítico para a determinação de diazepam e seu principal metabólito, nordiazepam, em plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD);
- c) validar metodologia para determinação urinária simultânea de ácido hipúrico e creatinina por CLAE-DAD;
- d) expor ratos ao tolueno e ao diazepam e, após esse tratamento, determinar os níveis de ácido hipúrico e de *orto*-cresol na urina e de diazepam e nordiazepam no plasma;
- e) avaliar estatisticamente os resultados obtidos entre os diferentes grupos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Na seção "MATERIAIS E MÉTODOS" serão relacionados os materiais e metodologias analíticas utilizadas no decorrer deste trabalho, bem como sobre a amostragem e os estudos estatísticos dos resultados obtidos.

4.1 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As determinações de DZP e seu metabólito, NOR, em plasma de ratos, e dos produtos de biotransformação do TOL, foram realizadas no Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Para tanto, os métodos de análise foram validados e/ou revalidados de acordo com a Resolução RDC n° 27, de maio de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012) e com o Guia de Validação Bioanalítica elaborado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).

4.1.1 Equipamentos Gerais

Os equipamentos utilizados nesse estudo foram: balança analítica Kern® (*Balingen*, Alemanha), estufa S.E. FANEM LTDA (São Paulo, Brasil), banho ultra-sônico Unique® (Indaiatuba, Brasil), centrífuga NT-811 Nova Técnica® (Piracicaba, Brasil), banho de água Nova Técnica® (Piracicaba, Brasil), pHmetro TecnoPON® (Piracicaba, Brasil), bomba à vácuo New Pump®, sistema de filtração de fase móvel Millipore® (*Darmstadt*, Alemanha), agitador de tubos Thermolyne® (*Dubuque*, EUA) e agitador magnético Novatecnica® (Piracicaba, Brasil).

4.1.2 Análise de orto-cresol em urina por CG-EM

A determinação de *o*-C em amostras de urina por CG-EM, com prévio preparo de amostras por ELL, foi realizada com base na metodologia seguida por Cosnier et al. (2013).

4.1.2.1 Reagentes e soluções

Os padrões de *o*-C (99,9%) e de *orto*-cresol deuterado (*o*-Cd₈, >98,0%) foram ambos obtidos da Sigma - Aldrich[®] (Steinheim, Alemanha). Uma solução estoque (SE) do analito foi preparada na concentração de 500 mg L⁻¹ em metanol (Panreac[®], Barcelona, Espanha). A SE foi posteriormente diluída nas seguintes concentrações para compor as soluções padrão intermediárias (SI): 0,6; 1,0; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0 mg L⁻¹ em metanol. A curva analítica foi preparada fortificando-se urina de rato com as SI, resultando nas concentrações de 0,06; 0,1; 0,3; 0,6; 1,2 e 2,4 mg L⁻¹. Como amostra branco foi utilizada urina não fortificada, oriunda de um *pool* de amostras de ratos. A solução de *o*-Cd₈ (padrão interno - PI) foi preparada na concentração de 6 mg L⁻¹ em água ultrapurificada. Todas as soluções padrão descritas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados à -20 °C e protegidas da luz, sendo que nessas condições são estáveis por seis meses, segundo Fustinoni et al. (2005).

Para o preparo da amostra foram utilizados os seguintes reagentes: ácido sulfúrico (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil), carbonato de sódio (CAAL[®], São Paulo, Brasil), éter diisopropílico (Honeywell[®], Seelze, Alemanha). Para o preparo de 500 mL da solução de carbonato de sódio 100 g L⁻¹, 50 g de carbonato de sódio foram transferidos para um balão volumétrico com capacidade de 500 mL e dissolvidos com água ultrapurificada até o volume nominal do balão.

Uma solução contendo *o*-C, *m*-C e *o*-Cd₈, todos na concentração de 2,5 mg L⁻¹ em metanol, foi preparada para identificação dos analitos. O padrão de *m*-C (>99,0) foi obtido da Fluka[®] (St. Gallen, Suíça).

4.1.2.2 Parâmetros analíticos

Para o preparo da amostra e análises, foram utilizados *vials* Supelco[®] (*Bellefonte*, Pensilvânia, EUA) com capacidade total de 10 mL, tampas de alumínio *crimp cap* (22 mm de diâmetro) e septos de silicone/PTFE (20 mm de diâmetro).

O processo de hidrólise do *o*-C conjugado foi realizado em estufa a 95 °C. O resfriamento da amostra após o procedimento de hidrólise se procedeu em *freezer* a -20°C.

Para a separação e detecção do analito utilizou-se o cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas GC-MS QP-2010 Plus Shimadzu[®] Corporation (*Kyoto*, Japão) operando por impacto de elétrons (IE) a 70 eV. A separação se processou em coluna capilar ZB-WAX (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do revestimento interno) da marca Phenomenex (*Torrance*, Califórnia, EUA). O injetor (modo de injeção *splitless*) equipado com *glass insert splitless* (Shimadzu[®]) de 4 mm de diâmetro interno com lâ de vidro, permaneceu na temperatura de 250 °C. O gás de arraste, hélio (pureza: 99,999%), apresentou fluxo de 1 mL min⁻¹ e a velocidade da purga de injeção foi de 3 mL min⁻¹. O forno de coluna foi configurado para iniciar a corrida cromatográfica em 140 °C, permanecendo assim por 8 minutos. Em seguida a temperatura foi aumentada linearmente a uma taxa de 25 °C min⁻¹ até 225 °C, permanecendo nessa condição por 2,5 minutos. Finalmente, a temperatura foi elevada até 250 °C a 25 °C min⁻¹ e foi mantida desse modo por 1 minuto. Nessas condições, o tempo total de corrida foi de 15,90 minutos.

O espectrômetro de massas foi configurado para manter a temperatura da fonte de ionização em 178 °C e da interface em 250 °C. O tempo de corte do solvente foi de 1 minutos. Em modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), os íons monitorados foram m/z 108 [$\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-OH}]^+$ e m/z 115 [$\text{CD}_3\text{-C}_6\text{D}_4\text{-OH}]^+$, para o *o*-C e para o *o*-Cd₈, respectivamente. Em modo SCAN, um escaneamento foi realizado no intervalo de m/z 40 - 200. Para aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o *software* GCMS - Solution[®].

4.1.2.3 Preparo da amostra

Após o descongelamento total da amostra de urina à temperatura ambiente, essa foi submetida à agitação e mantida em repouso por 5 minutos. Do sobrenadante, 0,6 mL de urina foi transferida para um *vial* de 10 mL. Posteriormente, 50 µL de ácido sulfúrico 95% (m/m) foram adicionados à mistura e, após vedação (*vial* com tampa de alumínio e septo de silicone/PTFE) e agitação vigorosa (1 minuto), os conjugados de *o*-C foram hidrolisados a 95

°C durante 2 horas. Após a hidrólise, a amostra foi retirada da estufa e após atingir temperatura ambiente, foi resfriada a -20 °C por 5 minutos. Imediatamente após a retirada da amostra do *freezer* (evitou-se perda de *o*-C livre por vaporização), removeu-se a tampa de alumínio para neutralização com 1 mL de carbonato de sódio 100 g L⁻¹ e adição de 50 µL do PI. Após homogeneização, a solução resultante foi transferida para um tubo de ensaio com capacidade de 5 mL. Ao hidrolisado, adicionou-se 500 µL de éter diisopropílico e, após agitação por 15 segundos, a amostra foi centrifugada a 715 g, por 10 min. Aproximadamente 300 µL do sobrenadante foram transferidos para o *vial* e uma alíquota de 1 µL foi injetada no CG-EM.

4.1.3 Análise de ácido hipúrico e creatinina em urina por CLAE-DAD

As análises de AH e CR em urina foram realizadas com base no método desenvolvido por Antunes, Patuzzi e Linden (2008), que consistiu na determinação de AH e CR por CLAE-DAD com prévio preparo de amostras por ELL.

4.1.3.1 Reagentes e soluções

Os padrões analíticos de AH (99%) e CR (>98%) foram obtidos da Sigma - Aldrich® (*Saint Louis*, EUA). A solução estoque (SE) de CR foi preparada na concentração de 50 mg mL⁻¹ em água ultrapurificada (Millipore®, *Darmstadt*, Alemanha). Nesta mesma concentração, foi preparada uma SE de AH em metanol (Panreac®, *Barcelona*, Espanha). As SE de AH e CR foram posteriormente diluídas nas seguintes concentrações para compor as soluções padrão de trabalho (ST): 2,5; 7,5; 17,5; 25,0; 37,5 e 50,0 mg mL⁻¹ em água ultrapurificada. As curvas analíticas foram preparadas fortificando-se urina com as ST, nas concentrações de 250, 750, 1750, 2500, 3750 e 5000 mg L⁻¹. Para os ensaios, foi utilizado um *pool* de urina de ratos. A amostra branco foi uma alíquota do mesmo *pool*, não fortificada com os analitos, e analisada nas mesmas condições dos calibradores. As soluções padrão foram armazenadas em tubos de polipropileno, hermeticamente fechados, sendo estáveis por 3 meses quando armazenados em *freezer* na temperatura de -20 °C (ANTUNES; NIEDERAUER; LINDEN, 2013). A

estabilidade das amostras e calibradores em matriz, quando armazenadas em *freezer* (-20 °C), foram determinadas pelo ensaio de estudo de estabilidade.

Para o preparo das soluções desse método utilizou-se metanol (Panreac[®], Barcelona, Espanha), acetonitrila (Lichrosolv[®], Darmstadt, Alemanha), água ultrapurificada, dihidrogenofosfato de potássio (Proquímica[®], Rio de Janeiro, Brasil), ácido fosfórico (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil) e hidróxido de potássio (Química Moderna, Barueri, Brasil). A solução tampão de dihidrogenofosfato de potássio pH 2,3 (50 mmol L⁻¹) foi preparada através da dissolução de 6,66 g de dihidrogenofosfato de potássio em 800 mL de água ultrapurificada, seguido pela adição de 4,8 g de ácido fosfórico 85% (v/v). O volume foi ajustado para 1000 mL com água ultrapurificada e o pH, acertado com a adição de ácido fosfórico ou hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹.

Para a fase móvel - tampão dihidrogenofosfato de potássio pH 2,3 (50 mmol L⁻¹): acetonitrila (85:15, v/v) - 150 mL de acetonitrila foram adicionados a 850 mL de tampão dihidrogenofosfato de potássio pH 2,3 (50 mmol L⁻¹) e homogeneizados. Após filtração à vácuo, através de membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com poros de 0,45 µm (Millipore[®], Darmstadt, Alemanha), a fase móvel foi degaseificada em banho ultrassônico por 15 minutos.

4.1.3.2 Parâmetros analíticos

As análises foram efetuadas utilizando-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) com bomba LC-AT vp e injetor automático SIL-10 AF, acoplado ao detector de arranjo de diodos SPD-M10A vp. A detecção foi realizada a 225 nm para todos os compostos, com a aquisição de espectros de varredura entre 200 e 380 nm. A separação analítica dos analitos se processou na coluna cromatográfica CLC - ODS (M) Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partículas. A coluna foi mantida a 30 °C durante toda a análise. Com sistema de eluição isocrática e vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹, obteve-se um tempo total de corrida de 8 minutos.

4.1.3.3 Preparo da amostra

Uma alíquota de 100 μL de urina previamente homogeneizada, foi diluída com 900 μL de água ultrapurificada (diluição 1:10), em tubo de ensaio de vidro. Esta mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex por 30 segundos e posteriormente centrifugada a 715 g, por 10 min. Uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi injetada no sistema CLAE-DAD.

4.1.4 Análise de diazepam e nordiazepam em plasma por CLAE-DAD

As análises de DZP e NOR, em plasma, foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Freire et al. (2005), a qual consiste basicamente na quantificação de DZP e NOR por CLAE-DAD com prévio preparo de amostras por ELL.

4.1.4.1 Reagentes e soluções

Os padrões de DZP (100%) e NOR foram gentilmente cedidos pelo laboratório União Química Farmacêutica Nacional S/A[®] (Pouso Alegre, MG, Brasil). O padrão interno utilizado foi o nitrazepam (NIT, 99,97%) (Sigma-Aldrich[®], *Saint Louis*, EUA) obtido na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila. Soluções estoque de DZP e NOR foram preparadas na concentração de 1 mg mL^{-1} em metanol e posteriormente diluídas (ST) a 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metanol.

As curvas analíticas foram preparadas fortificando-se plasma sanguíneo de ratos com as ST de DZP e NOR, resultando nas seguintes concentrações: 50; 150; 300; 600; 900 e 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como amostra branco foi utilizado plasma não fortificado. Um *pool* de plasma de animais não tratados com DZP e NIT foi utilizado para os ensaios.

Dentre os solventes e reagentes utilizados nesse método, estão: água ultrapurificada, acetonitrila (Lichrosolv[®], *Darmstadt*, Alemanha), metanol (Panreac[®], Barcelona, Espanha), etanol (Química Moderna[®], Barueri, Brasil), *n*-hexano (Honeywell[®], *Morristown*, EUA), dihidrogenofosfato de potássio (Proquímica[®], Rio de Janeiro, Brasil), hidrogenofosfato dissódico (Caal[®], São Paulo, Brasil), ácido fosfórico (Merck[®], *Darmstadt*, Alemanha), hidróxido de sódio (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brasil) e hidróxido de potássio (Química Moderna,

Barueri, Brasil). O gás nitrogênio (N₂), pureza de 99,998%, utilizado no preparo das amostras foi obtido da White Martins® (Cordovil, Rio de Janeiro, Brasil).

A solução de hidrogenofosfato dissódico pH 9,0, utilizada no procedimento de extração, foi preparada através da dissolução de 5,0 g de hidrogenofosfato dissódico em 100 mL de água ultrapurificada, seguindo-se por ajuste do pH para 9,0 com solução de hidróxido de sódio 10% (m/v) ou ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹.

A fase móvel utilizada para a eluição dos analitos foi composta de 69% da solução tampão de dihidrogenofosfato de potássio 10 mmol L⁻¹ e 31% de acetonitrila. O referido tampão foi preparado pela dissolução de 1,36 g de dihidrogenofosfato de potássio em 1000 mL de água ultrapurificada e teve seu pH ajustado para 3,5 com ácido fosfórico 0,1 mol L⁻¹ ou hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹. Após filtração à vácuo, através de membrana de PVDF com poros de 0,45 µm (Millipore®, Darmstadt, Alemanha), a fase móvel foi degaseificada em banho ultrassônico por 15 minutos.

4.1.4.2 Parâmetros analíticos

Para quantificação dos analitos foi utilizado um cromatógrafo a líquido Shimadzu® (Kyoto, Japão) com bomba LC-AT vp e injetor automático SIL-10 AF, acoplado ao detector de arranjo de diodos SPD-M10A vp. A detecção foi realizada a 228 nm para todos os compostos. A separação analítica se processou na coluna cromatográfica CLC - ODS (M) Shimadzu® (Kyoto, Japão) - 150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partículas e pré-coluna C18 (4,0 mm x 4,6 mm, 5 µm). A coluna foi mantida a 35 °C durante toda a análise. A vazão da fase móvel foi de 1,5 mL min⁻¹, obtendo-se um tempo total de corrida de 25 minutos.

4.1.4.3 Preparo da amostra

Em tudo de ensaio de vidro foram adicionados 0,5 mL de plasma, 10 µL de NIT 100 µg mL⁻¹ (PI), 2 mL de tampão hidrogenofosfato dissódico, pH 9,0, e 5 mL de *n*-hexano: etanol (90:10, v/v). Após agitação por 3 minutos, em vórtex, a amostra foi centrifugada a 715 g, por 8 minutos. Após esse tempo, 3 mL da fase orgânica foi coletada e evaporada a 60 °C, em banho

de água e sob fluxo de gás nitrogênio (N₂). No resíduo seco foram adicionados 400 µL de fase móvel e, após homogeneização, 50 µL foram injetados no CLAE-DAD.

4.1.5 Validação Analítica

Os métodos foram validados total ou parcialmente, dependendo do mesmo já ter sido, ou não, desenvolvido no LATF. Assim, os seguintes parâmetros de confiabilidade, descritos abaixo, foram aplicados aos diferentes métodos utilizados no presente estudo, de acordo com a Resolução RDC n° 27, de maio de 2012, da ANVISA (BRASIL, 2012) e com o Guia de Validação Bioanalítica, elaborado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2001).

4.1.5.1 Linearidade

A linearidade, na faixa de concentração das curvas analíticas preparadas, foi avaliada através do estabelecimento da correlação entre o sinal analítico obtido e/ou razão analito/padrão interno, plotadas no eixo y, em função das concentrações nominais em matriz (urina ou plasma) no eixo x. A equação estimada que expressou a correlação linear dos dados gerados das extrações dos pontos de calibração, em triplicata, foi do tipo $y = ax + b$, sendo a , a inclinação, b o intercepto no eixo y e r^2 , o coeficiente de determinação. Os testes de linearidade foram considerados aceitáveis quando estes atenderam aos seguintes critérios:

- I - Desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do limite inferior de quantificação (LIQ);
- II - Desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os demais padrões;
- III - Coeficiente de determinação $\geq 0,99$.

4.1.5.2 Seletividade

Para verificação da seletividade, seis fontes distintas de matriz foram analisadas buscando-se possíveis interferentes nos tempos de eluição dos analitos. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos de amostras de LIQ extraído. A obtenção de cromatogramas com áreas de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos e do PI inferiores, respectivamente, a 20% da área do LIQ e 5% da área na concentração utilizada, confirma a seletividade do método.

4.1.5.3 Limite de quantificação

Foi adotado como LIQ o ponto mais baixo da curva analítica que apresentou precisão e exatidão.

4.1.5.4 Precisão e Exatidão

Para a avaliação da precisão e da exatidão intradia foram analisadas 5 alíquotas de amostras fortificadas preparadas em três concentrações diferentes (dentro do intervalo linear). A precisão e a exatidão interdia foram determinadas da mesma maneira, porém as análises se repetiram durante três dias consecutivos.

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (quinze por cento), exceto para o LIQ, o qual se admitiu valores menores ou iguais a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir (Equação 1):

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão foi expressa pelo Erro relativo (E%), não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor nominal, exceto para o LIQ, o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ (vinte por cento) do valor nominal, segundo a fórmula a seguir (Equação 2):

$$E\% = \left[\frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \right] - 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.1.5.5 Efeito residual

O efeito residual (*carry-over*) foi estudado mediante injeções de amostra branco antes (duplicata) e após (triplicata) as corridas de amostras fortificadas (triplicata) dos pontos de maior concentração da curva analítica. Para avaliação do efeito residual considerou-se que:

- I - As respostas de picos interferentes no tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta dos analitos nas amostras processadas do LIQ;
- II - As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI.

4.1.5.6 Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração (recuperação), soluções padrão preparadas em matriz tiveram seus sinais analíticos comparados com padrões não extraídos na mesma concentração. O cálculo da eficiência de extração (Equação 3) foi aplicado a todos os métodos, respeitando as peculiaridades. O CV% das replicatas dos pontos analisados no teste deverá ser $\leq 15\%$ (quinze por cento).

$$R\% = \frac{\text{Padrão extraído}}{\text{Padrão não extraído}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

4.1.5.7 Estabilidade

Foi avaliada a estabilidade dos analitos quando estes foram submetidos a ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente) durante três dias e pós-processamento (amostras fortificadas extraídas mantidas em temperatura ambiente durante 8 horas). Para critérios de aprovação dos testes de estabilidade tolerou-se um erro relativo de até $\pm 15\%$, porém em relação à concentração determinada inicialmente e não à concentração teórica.

4.2 AMOSTRAGEM

Nesta seção estão descritas as informações referentes à amostragem e ao protocolo de exposição dos animais.

4.2.1 Animais

Os estudos foram realizados em ratos machos, Wistar, de 250 ± 10 g, proveniente do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Antes dos experimentos os animais permaneceram no biotério institucional para adequação do peso corporal e adaptação ao ambiente (sob ciclo luz-escuro de 12 horas), com temperatura da sala de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $60 \pm 20\%$ e livre acesso à ração e água.

As amostras de urina e plasma, utilizadas nas validações das metodologias analíticas, foram coletadas de ratos machos, Wistar, de 250 ± 10 g. Antes das coletas os animais permaneceram no biotério institucional para adequação do peso corporal e adaptação ao ambiente (sob ciclo luz-escuro de 12 horas), com temperatura da sala de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $60 \pm 20\%$ e livre acesso à ração e água.

4.2.2 Protocolo Experimental

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP e obteve aprovação através do parecer n° 27/2015 expedido pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Anexo I). Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento experimental para a verificação da interferência do DZP em bioindicadores de dose interna do TOL em ratos.

Grupo (n= 5 animais)	Característica do grupo
1 (CTRL)	Controle: não exposto ao DZP e ao TOL
2 (GTOL)	Exposto ao TOL
3 (GTOL/DZP)	Exposto ao TOL e ao DZP
4 (GDZP)	Exposto ao TOL

Fonte: Do Autor.

Abaixo segue uma descrição geral do protocolo experimental:

- Grupo 1 (n=5) - Controle (CTRL): os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, expostos apenas ao ar atmosférico (CARDOSO, 2012). Antes de cada exposição os animais receberam, por via oral (gavagem), solução diluente. Ao final dos ciclos de exposição, os ratos permaneceram durante a noite (16 h) em gaiolas metabólicas de policarbonato (Nalgene®, EUA) para coleta da urina. Na manhã seguinte, os animais foram submetidos à eutanásia pelo método de decapitação por guilhotina (NEVES; FILHO; MENEZES, 2013). O sangue total foi coletado em tubos contendo heparina e, após homogeneização, foram centrifugados (715 g, por 10 minutos) para separação do plasma sanguíneo. Todas as amostras foram armazenadas a -70°C até o momento das análises.

- Grupo 2 (n=5) - Exposto ao TOL (GTOL): os animais foram tratados com vapor de TOL 99,9% (Sigma - Aldrich®, *Steinheim*, Alemanha) por inalação, na concentração de 75,4 mg m⁻³ (TLV-TWA), 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle (ACGIH, 2010; CARDOSO, 2012). Antes de cada exposição os animais receberam, por via oral (gavagem), solução diluente. Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como a eutanásia dos animais, foram conforme o descrito para o grupo controle.

- **Grupo 3 (n=5) - Exposto ao TOL e ao DZP (GTOL/DZP):** os animais foram tratados com vapor de TOL 99,9% (Sigma - Aldrich®, *Steinheim*, Alemanha) por inalação, na concentração de 75,4 mg m⁻³ (TLV-TWA), 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle (ACGIH, 2010; CARDOSO, 2012). Antes de cada exposição os animais receberam, por via oral (gavagem), DZP diluído em solução diluente, na dose de 10 mg Kg⁻¹ (WALKER et al. 1998). Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como a eutanásia dos animais, foram conforme o descrito para o grupo controle.

- **Grupo 4 (n=5) - Exposto ao DZP (GDZP):** os animais foram imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, expostos apenas ao ar (CARDOSO, 2012). No início de cada dia de experimento os animais receberam, por via oral (gavagem), DZP diluído em solução diluente, na dose de 10 mg Kg⁻¹ (WALKER et al. 1998). Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como a eutanásia dos animais, foram conforme o descrito para o grupo controle.

A solução de DZP administrada aos animais foi preparada na concentração de 10 mg mL⁻¹ em solução diluente (polietilenoglicol 400: salina - 70: 30, v/v). O sal de DZP (lote: 11124586A) utilizado no preparo foi obtido da Pharma Nostra® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) apresentando teor igual a 100,25% (base anidra).

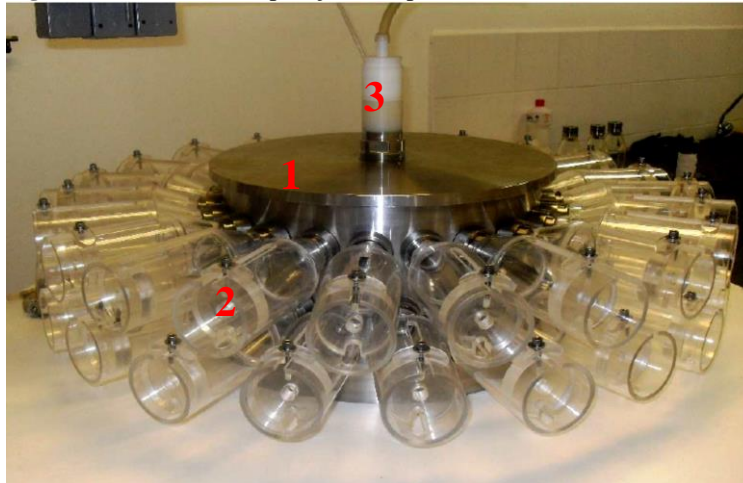
4.2.3 Câmara de exposição

Os animais foram expostos ao TOL em uma câmara do tipo *Nose Only Exposure System* (NOES) situada no biotério da disciplina de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, onde está alocada em uma sala de 14 m².

A câmara de exposição (Figura 5) é dotada de 44 portas, com a possibilidade da exposição simultânea de até 42 animais - considerando a reserva de, no mínimo, duas portas para monitoramento da atmosfera experimental. No seu interior existem duas câmaras circulares concêntricas: uma interna que recebe a atmosfera em teste e a distribui às portas, e uma externa, que recebe o material não inalado, assim como os gases exalados pelos animais.

Tais gases são removidos por uma bomba aspirante de vazão programável em função do fluxo que ingressa, de modo a evitar pressões positivas ou negativas no interior do sistema.

Figura 5 - Câmara de exposição do tipo NOES.



Fonte: Cardoso (2012).

Nota: Visão geral da câmara de exposição (1) com os contentores de acrílico (2) acoplados às 44 portas disponíveis e do sistema exaustor (3).

Os animais, acomodados em contentores de acrílico (Figura 6 - B), são posicionados nas portas de exposição para inalarem, através do orifício central presente no encaixe de inox, o solvente disperso no ar distribuído pelo interior do equipamento. O contendor apresenta uma tampa posterior deslizante, também de acrílico, para permitir ajuste ao tamanho do animal (Figura 6 - A).

Figura 6 - Contentores de acrílico.



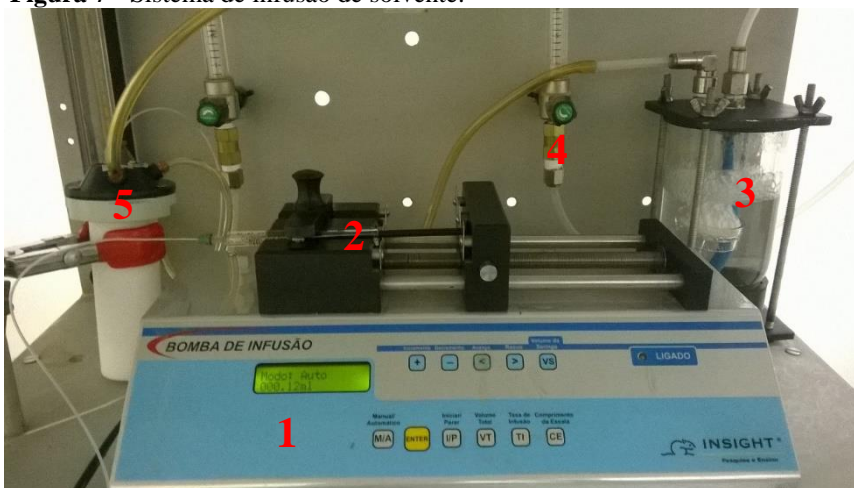
Fonte: Do autor.

Notas: A - Contendor com corpo de acrílico e encaixe de aço inox; B - Animais acomodados nos contentores prontos para o procedimento de exposição.

Para a geração da atmosfera experimental (Figura 7) o ar comprimido é dividido em dois fluxos, sendo o principal, umidificado por borbulhamento em água destilada, e um

secundário, usado para carrear o solvente, o qual é bombeado continuamente por uma bomba de infusão (Insight®, Ribeirão Preto, Brasil), usando uma seringa “*gas-tight*”. Os fluxos são recombinados e turbilhonados por estreitamento do tubo que conduz a mistura para ingressar na câmara de exposição já homogeneizada.

Figura 7 - Sistema de infusão de solvente.



Fonte: Do autor.

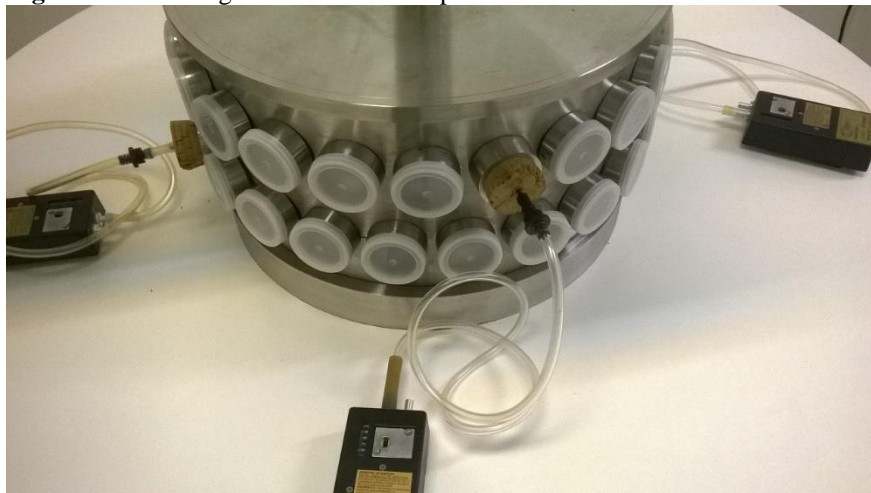
Notas: Visão geral do sistema de formação da atmosfera experimental constituído basicamente por uma bomba de infusão (1), uma seringa “*gas-tight*” (2), sistema umidificador de ar (3), entrada de ar comprimido (4) e sistema gerador de atmosfera (5).

4.2.3.1 Validação da câmara para tolueno

Após ajustes da taxa de infusão de TOL, para obtenção da concentração desejada na câmara de exposição, as amostras da atmosfera experimental foram coletadas em duas portas diametralmente opostas para cada um dos dois planos da câmara (superior e inferior) em que se acoplam os contentores para os animais, de modo a possibilitar a identificação da eventual formação de gradientes de concentração, tanto no plano horizontal quanto no vertical. A validação do equipamento foi realizada pela verificação das variações de concentração da atmosfera produzida entre as portas de exposição e entre os planos superior e inferior (homogeneidade), assim como ao longo do tempo (avaliação da estabilidade de curta duração - durante um ciclo de exposição de seis horas, e de longa duração - coletas semanais). Para os ensaios de homogeneidade e estabilidade de curta duração foram realizadas coletas na primeira, terceira e sexta hora de funcionamento da câmara, já para os ensaios de estabilidade de longa duração as amostragens eram procedidas na terceira hora do terceiro dia útil da semana.

As amostras foram coletadas em tubos de coleta Anasorb[®] CSC 100/50 mg (SKC, Blandford Forum, Reino Unido), usando bombas amostradoras de ar, modelo 223-3 (SKC[®] Inc., Eighty Four, PA, EUA), operando na vazão de 50 mL min⁻¹ por 30 minutos (Figura 8).

Figura 8 - Amostragem da atmosfera experimental.



Fonte: Do autor.

Nota: Amostragem da atmosfera experimental através de bombas amostradoras de ar dispostas diametralmente nos dois patamares da câmara.

As análises das amostras de ar coletadas na câmara foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, seguindo-se a seguinte metodologia: remover o adsorvente do tubo coletor e transferi-lo para *vial* de vidro de 5 mL. Adicionar 2 mL de solução de dissulfeto de carbono e 3 µL do padrão interno (isopropilbenzeno) no *vial* com a amostra. Repousar por 30 minutos. Após o repouso, agitar e transferir 1 mL da solução para *vial* recravável. Injetar 1 µL no cromatógrafo gasoso. Utilizou-se para as análises o cromatógrafo gasoso Perkin Elmer[®] Modelo Clarus 680 (Massachusetts, EUA) com injetor automático, acoplado a um detector de ionização por chama e equipado com a coluna cromatográfica Elite-624 Perkin Elmer[®] (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 1,4 µm de espessura do revestimento interno), nas seguintes condições: coluna a 60 °C por 1 min, aquecimento a 20 °C min⁻¹ até 110 °C e aumento linear de temperatura (10 °C min⁻¹) até 180 °C, mantidos por 1 min. O injetor e o detector foram mantidos a 180 °C e 200 °C, respectivamente.

4.3 CORRELAÇÃO E AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os testes estatísticos relacionados à validação das metodologias e aos resultados das determinações dos analitos de interesse, após o protocolo de exposição dos animais, foram realizados com o auxílio do *software* GraphPad Prism (versão 5.03 para Windows, GraphPad Software, Inc., *San Diego, California*, EUA).

A homogeneidade da atmosfera de exposição de TOL gerada na câmara foi verificada pela comparação das concentrações obtidas nos planos inferior e superior usando o teste *t* de *Student*. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

Os resultados das análises dos BI, AH e *o*-C, foram expressos através da mediana, média, erro padrão da média (EP) e intervalo de confiança (IC 95%). A comparação de dados entre os grupos foi analisada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney para dados não pareados com nível de significância de 5%. Medianas foram consideradas significativamente diferentes se $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em seguida foram discutidos os resultados obtidos.

5.1 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Os resultados obtidos das validações das metodologias analíticas utilizadas neste trabalho foram expostos e discutidos a seguir.

5.1.1 Análise de orto-cresol em urina por CG-EM

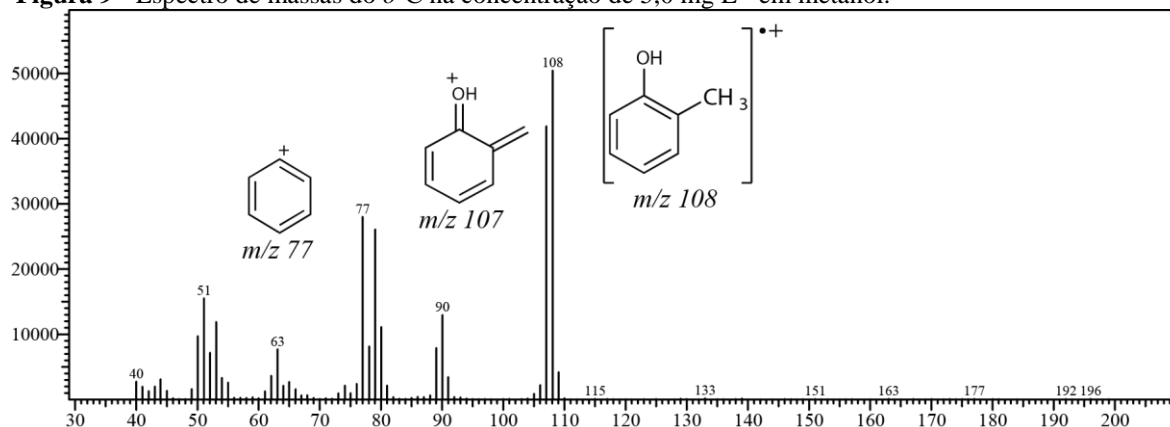
A execução da metodologia descrita por Cosnier et al. (2013), com pequenas modificações, demonstrou-se satisfatória e de fácil execução, apresentando separação cromatográfica adequada para a detecção dos analitos *o*-C e do padrão interno, *o*-Cd₈. O *o*-C é excretado de forma conjugada na urina (glucoronídeos e sulfatos), portanto, a hidrólise ácida, em altas temperaturas, foi necessária para que o analito, na forma livre, pudesse ser extraído pelo solvente extrator. A forma livre de *o*-C é, conseqüentemente, mais apolar do que o conjugado, apresentando assim, maior afinidade pela fase apolar do sistema de extração. Segundo Alvarez-Leite (2014), a proporção de *o*-C na urina de indivíduos expostos ao TOL é da ordem de 0,1% em relação ao total de metabólitos, exigindo-se assim, métodos de determinação com detectabilidade e sensibilidade adequadas. Apesar da cromatografia gasosa já ser uma técnica que possibilita quantificação dos analitos em baixas concentrações, com o seu acoplamento ao espectrômetro de massas, baixos limites de quantificação puderam ser atingidos.

Para a determinação da fração livre de *o*-C presente naturalmente na urina, o sinal analítico correspondente ao *o*-C de uma amostra do animal exposto, submetida ao procedimento de extração, sem a etapa de hidrólise, foi comparado ao sinal da mesma amostra, mas com esta preparada de acordo com o item 4.1.2.3. Pelos resultados obtidos foi possível verificar que 96% do *o*-C excretado apresenta-se na forma conjugada.

Para este trabalho não foi possível determinar a eficiência da hidrólise ácida devido a não disponibilidade de um padrão de *o*-C conjugado. Contudo, Fustinoni et al., em 2005, realizando um preparo de amostras semelhante a este estudo, avaliaram a eficácia da hidrólise ácida utilizando como analito o fenol- β -D-glucoronídeo, substância conjugada com características semelhantes ao *o*-C. Nesse ensaio pôde-se verificar que acima de 97% dos conjugados foram hidrolisados.

Após a extração do *o*-C e do *o*-Cd₈, por ELL, e a separação cromatográfica no CG-EM, os analitos foram fragmentados/ionizados na câmara de ionização presente no espectrômetro de massas, através de um fluxo de elétrons específico, a 70 eV, produzido por um filamento de tungstênio. Os íons gerados, ao passar pelo analisador de massas, foram separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z) e, assim, detectados, gerando o sinal analítico e o espectro de massas (BONATO, 2006). Os íons utilizados para a identificação do *o*-C foram os que obtiveram m/z 108, 107 e 77 (Figura 9).

Figura 9 - Espectro de massas do *o*-C na concentração de 5,0 mg L⁻¹ em metanol.

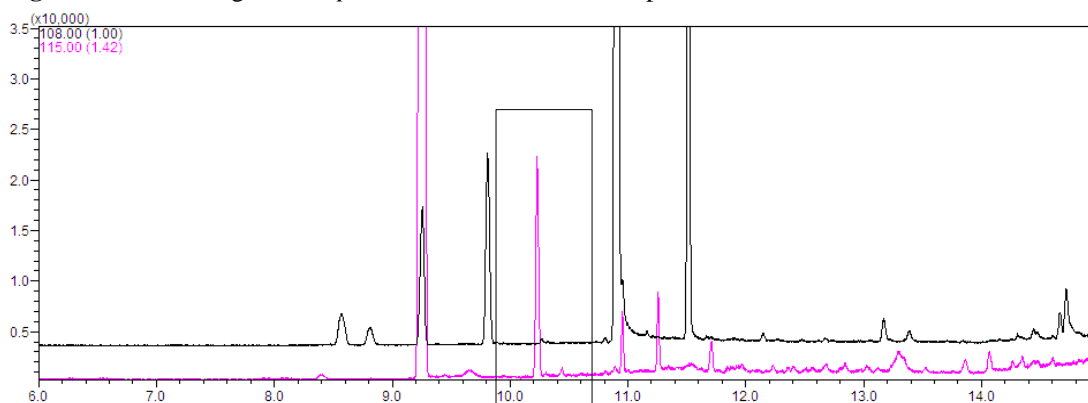


Fonte: Do Autor.

Notas: Com o equipamento operando no modo *Full SCAN*, os íons de m/z 108, 107 e 77 foram os que apresentaram maior abundância. As condições cromatográficas e parâmetros de análise estão descritos no item 4.1.2.2.

Com os ensaios para verificação da seletividade e identificação foi possível identificar os analitos através dos tempos de retenção e das m/z dos mesmos. Nas análises do *pool* de urina de ratos não expostos não foram observados interferentes nas regiões de eluição dos analitos, constando somente o pico de *o*-C endógeno (Figura 10).

Figura 10 - Cromatograma do *pool* de urina de ratos não expostos.

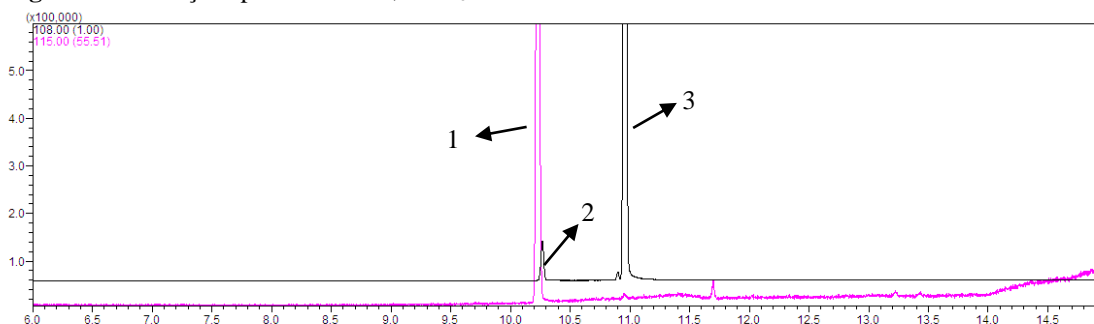


Fonte: Do Autor.

Notas: Cromatograma obtido após injeção de *pool* de urina de animais não expostos ao TOL e ao DZP. A análise se processou no CG-EM, com este operando no modo SIM (m/z 108 e 115). No destaque da figura (m/z 108) é possível observar o pico do *o*-C endógeno. As condições cromatográficas e parâmetros de análises foram os mesmo do método descrito no item 4.1.2.2.

Para a quantificação de *o*-C foi escolhido seu íon de maior abundância, m/z 108, e para o padrão interno *o*-Cd₈, m/z 115. O tempo médio de retenção do *o*-Cd₈ foi de 10,26 minutos e do *o*-C foi de 10,28 minutos. (Figura 11).

Figura 11 - Soluções padrão de *o*-C, *o*-Cd₈ e *m*-C.

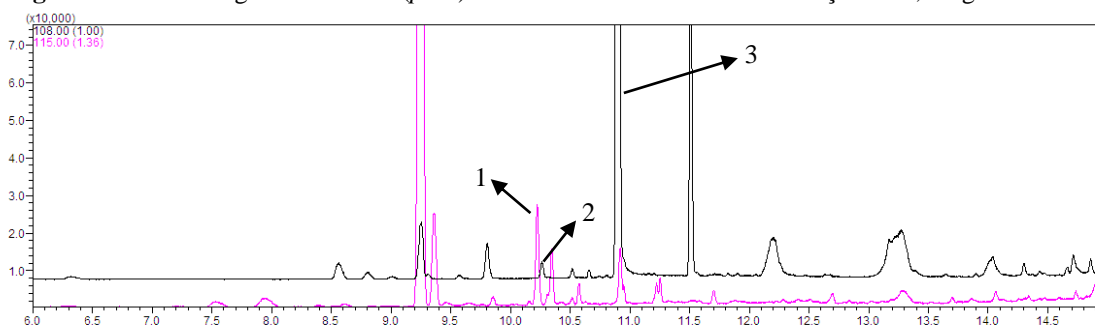


Fonte: Do Autor.

Notas: Cromatograma obtido após injeção líquida do padrão *o*-C, *m*-C e *o*-Cd₈ em metanol na concentração de 2,5 mg L⁻¹ no CG-EM, com este operando no modo SIM (m/z 108 e 115). 1 - *o*-Cd₈, 2 - *o*-C e 3 - *m*-C. As condições cromatográficas e parâmetros de análises foram os mesmo do método descrito no item 4.1.2.2.

A separação cromatográfica foi suficiente para resolver o *o*-C dos demais isômeros, *p*-C e *m*-C (Figura 12). Contudo, em colunas cromatográficas convencionais, *m*-C e *p*-C coeluem-se, gerando apenas um pico cromatográfico. A separação desses dois isômeros é possível somente com a utilização de colunas cromatográficas específicas para análises de compostos quirais (FUSTINONI et al. 2005).

Figura 12 - Cromatograma de urina (*pool*) fortificada com *o*-C na concentração de 0,6 mg L⁻¹.



Fonte: Do Autor.

Notas: Cromatograma obtido após injeção de urina (*pool*) fortificada na concentração de 0,6 mg L⁻¹ no CG-EM, com este operando no modo SIM (m/z 108 e 115). 1 - *o*-Cd₈, 2 - *o*-C e 3 - *p*-C+*m*-C. As condições cromatográficas e parâmetros de análises foram os mesmo do método descrito no item 4.1.2.2.

O *o*-C pode estar presente na urina de pessoas não expostas ao TOL e não fumantes como evidenciado pela ACGIH (2010) através da notação "B" (*Background*). Desse modo, torna-se impossível obter a matriz isenta do analito, sendo necessária a subtração do sinal analítico gerado pela fração de *o*-C endógena dos pontos de calibração.

O método apresentou-se linear (Figura 13) para o intervalo de concentração de 0,06 a 2,4 mg L⁻¹, com coeficiente de determinação de 0,9993 (Tabela 3). No estudo conduzido por Cosnier et al. (2013), o intervalo linear foi de 0,1 a 15 mg L⁻¹, contudo, para o presente trabalho avaliou-se a linearidade do método somente até 2,4 mg L⁻¹, sendo suficiente para a finalidade a qual se destina.

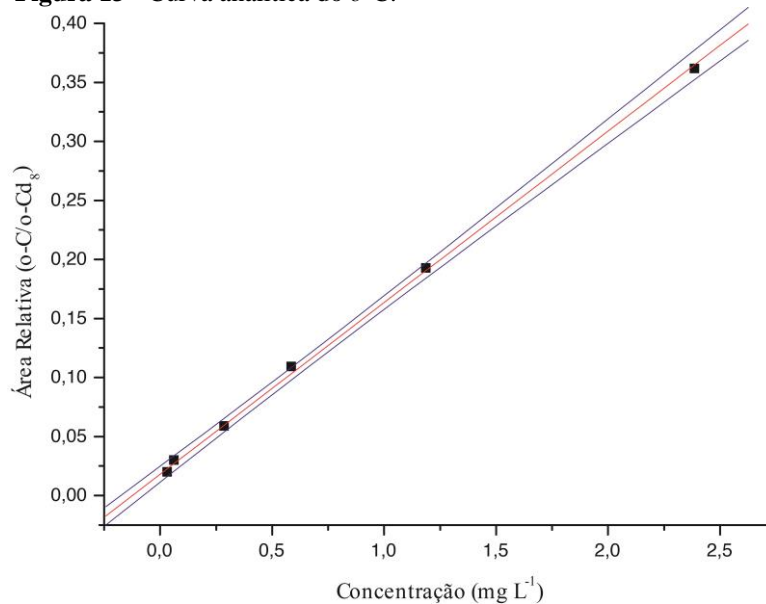
Tabela 3 - Resultados da linearidade do método de determinação de *o*-C em urina.

<i>Orto</i> -Cresol	
Intervalo linear (mg L ⁻¹)	0,06 - 2,4
$a^i \pm EP_a^{ii}$ (n=3)	$0,1426 \pm 2,11 \times 10^{-3}$
$b^i \pm EP_b^{ii}$ (n=3)	$0,0024 \pm 2,6 \times 10^{-3}$
r^2 (n=3)	0,9993

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Equação de regressão linear: $y = ax + b$, em que a representa a inclinação da reta e b o intercepto no eixo das ordenadas. O coeficiente de determinação é dado por r^2 .

ⁱⁱ Erro Padrão da média: $EP = \pm DP / \sqrt{n}$.

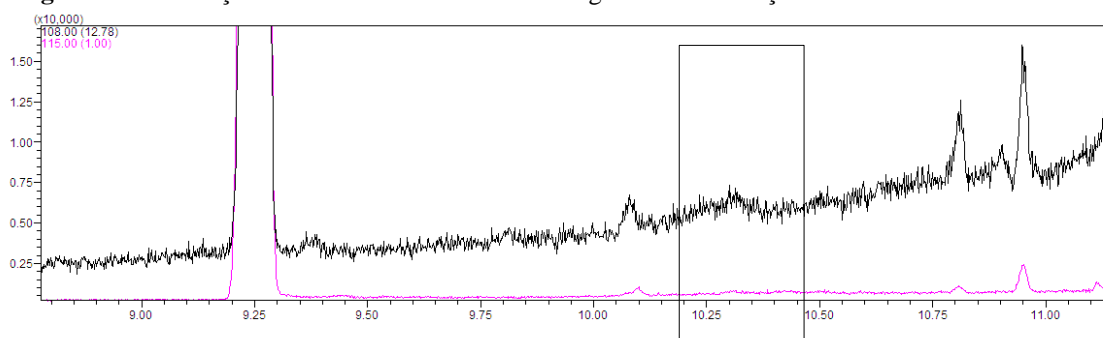
Figura 13 - Curva analítica do *o*-C.

Fonte: Do Autor.

Nota: A linha em vermelho representa a reta estimada na regressão linear e as linhas em azul são os IC 95% superior e inferior.

Para a determinação da eficiência do procedimento de extração (recuperação), amostras enriquecidas com soluções padrão de *o*-C (0,6 e 1,2 mg L⁻¹ em urina), adicionadas após a hidrólise e neutralização, foram preparadas como o descrito no item 4.1.2.3. Os sinais analíticos de *o*-C dessas amostras foram comparados com padrões não extraídos (soluções padrão adicionadas a extratos de urina branco). Os valores de recuperação calculados encontraram-se na faixa de 70 a 86%.

Através de corridas cromatográficas subsequentes a uma injeção de amostra fortificada na concentração de 2,4 mg L⁻¹ (limite superior de quantificação) pôde-se observar a ausência de efeito residual (Figura 14).

Figura 14 - Avaliação do efeito residual na metodologia de determinação de *o*-C em urina.

Fonte: Do Autor.

Notas: Corrida executada após o ponto mais alto da curva analítica nas condições cromatográficas determinadas no item 4.1.2.2. Pôde-se observar ausência de picos no tempo de retenção do analito em estudo (tempo médio de retenção do *o*-C: 10,28 min; e *o*-Cd₈: 10,26 min).

A estabilidade do analito em urina e em água foi descrita por Fustinoni (2005), sendo estável por 6 meses quando armazenado a -20°C , no escuro. No presente estudo foi avaliada a estabilidade do analito, nas concentrações de $0,06\text{ mg L}^{-1}$ e $1,2\text{ mg L}^{-1}$, quando submetidos a ciclos de congelamento, a -20°C , e descongelamento, em temperatura ambiente, durante três dias. O analito permaneceu estável na amostra, durante o período avaliado, uma vez que os resultados de erro relativo foram de $-1,6$ e $-2,7$, para $0,06\text{ mg L}^{-1}$ e $1,2\text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, e, portanto, inferiores a 15%.

Pelos ensaios executados nessa validação, foi possível obter o LIQ de $0,06\text{ mg L}^{-1}$, atingindo concentração menor do que a encontrada por Cosnier et al. (2013), de $0,1\text{ mg L}^{-1}$, que foi a mesma relatada por Paiva, Martins e Siqueira (2007), os quais, quantificaram *o*-C em urina utilizando a técnica de SPME-HS, no preparo de amostras e GC-FID, para quantificação. A Tabela 4 mostra os dados referentes ao limite de quantificação, precisão e exatidão interdia e intradia do método de determinação do metabólito *o*-C em urina.

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de *o*-C em urina: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.

(continua)

<i>Orto</i> -Cresol				
LIQ ($0,06\text{ mg L}^{-1}$)	Média (n=6)	Concentração Teórica do <i>o</i> -C (mg L^{-1})		
		0,30	0,60	1,20
	CV% ⁱ	4,86		
	%E ⁱⁱ	-0,43		
Dia 1	Média (n=5)	0,27	0,64	1,20
	CV% ⁱ	11,92	8,75	6,44
	%E ⁱⁱ	-8,47	6,20	0,38
Dia 2	Média (n=5)	0,32	0,54	1,34
	CV% ⁱ	11,77	13,33	5,36
	%E ⁱⁱ	6,88	-10,22	11,27
Dia 3	Média (n=5)	0,31	0,65	1,38
	CV% ⁱ	5,70	2,84	6,32
	%E ⁱⁱ	4,63	8,86	14,83

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de *o*-C em urina: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.

(conclusão)

<i>Orto</i> -Cresol		Concentração Teórica do <i>o</i> -C (mg L ⁻¹)		
		0,30	0,60	1,20
Dias 1 - 3	Média (n=15)	0,30	0,61	1,31
	CV% ⁱ	8,20	10,17	8,83
	%E ⁱⁱ	1,01	1,61	8,83

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Precisão ($CV\% = [\text{Desvio Padrão} / \text{Média}] \times 100$).

ⁱⁱ Exatidão. Calculada através da equação que expressa a inexatidão do método:

$$\%E = [(Concentração\ média\ experimental / Concentração\ Teórica) \times 100] - 100.$$

Os resultados de precisão e exatidão interdia e intradia foram bem semelhantes aos obtidos no método seguido por Cosnier et al. (2013), e comparáveis aos resultados obtidos no estudo realizado por Fustinoni et al. (2005), no qual determinou-se *o*-C e *m*-C por CG-EM com prévio preparo de amostras por SPME-HS. Desse modo, mesmo com os procedimentos de hidrólise e extração dos analitos pela ELL, os resultados apresentaram repetitividade e baixos desvios em relação às concentrações nominais em todas as concentrações estudadas.

5.1.2 Análise de ácido hipúrico e creatinina em urina por CLAE-DAD

O estudo realizado por Antunes, Patuzzi e Linden (2008) foi adotado como referência, uma vez que os autores determinaram, em uma única corrida cromatográfica, o AH, principal produto de biotransformação do TOL, e a CR, produto da degradação da fosfocreatina nos músculos, que, devido a sua eliminação constante, a uma taxa diretamente proporcional a massa muscular do indivíduo, é utilizada para a correção dos resultados dos analitos determinados na urina de trabalhadores expostos aos agentes químicos, uma vez que a amostra coletada, geralmente, no final da jornada de trabalho, pode não ser representativa. Órgãos responsáveis pela regulamentação da exposição ocupacional aos xenobióticos, como a ACGIH, preconizam que amostras de urina muito concentradas ou muito diluídas não são apropriadas para fins de monitoramento, considerando adequadas aquelas amostras de urina que apresentam níveis de CR compreendidos entre 0,3 a 3,0 g/L. Para os bioindicadores avaliados no presente estudo, é necessário expressar os resultados corrigidos pela CR, com o intuito de considerar a depuração renal, que pode ser variável (NARAYANAN; APPLETON, 1980; ACGIH, 2010).

A curva analítica foi preparada pela fortificação da matriz (urina animal) com soluções padrão de AH e CR, no intervalo de 250 a 5000 mg L⁻¹. Apesar do AH ser o indicador biológico de escolha na legislação brasileira para o monitoramento da exposição ao TOL, ele está presente naturalmente na urina de indivíduos não expostos, decorrente de dietas alimentares que contenham ácido benzoico e/ou seus precursores. Já a CR, por ser um metabólito da fosfocreatina muscular, é excretada constantemente pelo organismo, na urina (ALVAREZ-LEITE, 2014). Considerando esses fatos, quando não existe a possibilidade de proceder à validação analítica com a matriz isenta dos analitos de interesse, alguns órgãos regulatórios permitem que ensaios sejam realizados com soluções padrão em solvente, contanto que seja comprovada a ausência do efeito de matriz. Porém, a curva analítica deve ser preparada na mesma matriz biológica a qual o estudo será destinado, a fim de compensar a influência de interferentes presentes em amostras complexas (RIBANI et al. 2004). O intervalo estudado por Antunes, Patuzzi e Linden (2008) foi de 250 a 3000 mg L⁻¹.

Assim como na metodologia de determinação de *o*-C, com a curva analítica preparada em urina, tornou-se necessária a subtração do sinal analítico gerado pela fração de AH e CR endógenas dos pontos de calibração.

Tabela 5 - Resultados da linearidade do método de determinação de AH e CR em urina.

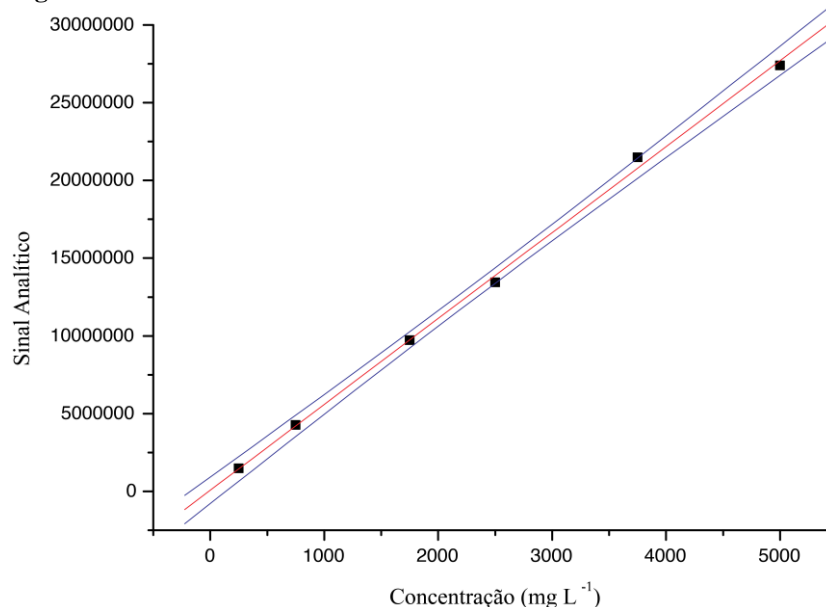
	AH	CR
Intervalo linear (mg L ⁻¹)	250 - 5000	250 - 5000
$a^i \pm EP_a^{ii}$ (n=3)	$5525 \pm 1,08 \times 10^2$	$2543 \pm 1,06 \times 10^2$
$b^i \pm EP_b^{ii}$ (n=3)	$69188 \pm 3,08 \times 10^5$	$410028 \pm 3,03 \times 10^5$
r^2 (n=3)	0,9985	0,9931

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Equação de regressão linear: $y = ax + b$, em que a representa a inclinação da reta e b o intercepto no eixo das ordenadas. O coeficiente de determinação é dado por r^2 .

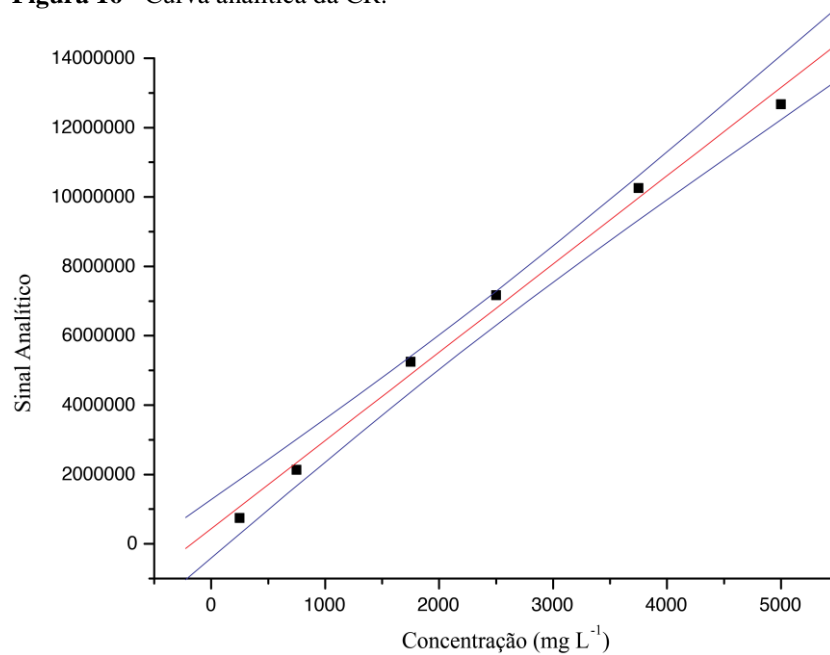
ⁱⁱ Erro Padrão da média: $EP = \pm DP / \sqrt{n}$.

Conforme pôde ser observado na Tabela 5, o método foi linear no intervalo de concentração pesquisada para ambos os analitos (Figura 15 e 16). Wetmore et al., em 2008, realizou estudo similar ao do presente trabalho, porém verificou as interações na exposição simultânea de TOL e benzeno em camundongos. Os valores de AH relatados, em camundongos expostos a concentrações de 0 e 100 ppm, foram de 0,3 e 0,5 g g⁻¹ de CR, respectivamente. Sendo assim, o intervalo de concentração estudado pôde ser considerado adequado para a determinação de AH já que os teores dos metabólitos em urina são semelhantes em humanos e camundongos (COSNIER et al. 2014).

Figura 15 - Curva analítica do AH.

Fonte: Do Autor.

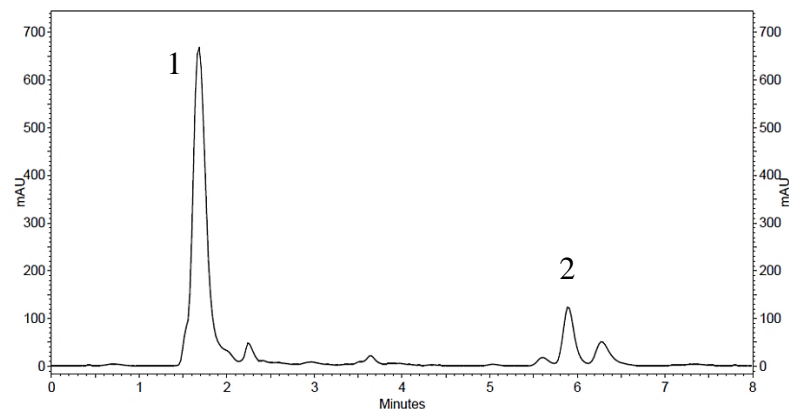
Nota: A linha em vermelho representa a reta estimada na regressão linear e as linhas em azul são os IC 95% superior e inferior.

Figura 16 - Curva analítica da CR.

Fonte: Do Autor.

Nota: A linha em vermelho representa a reta estimada na regressão linear e as linhas em azul são os IC 95% superior e inferior.

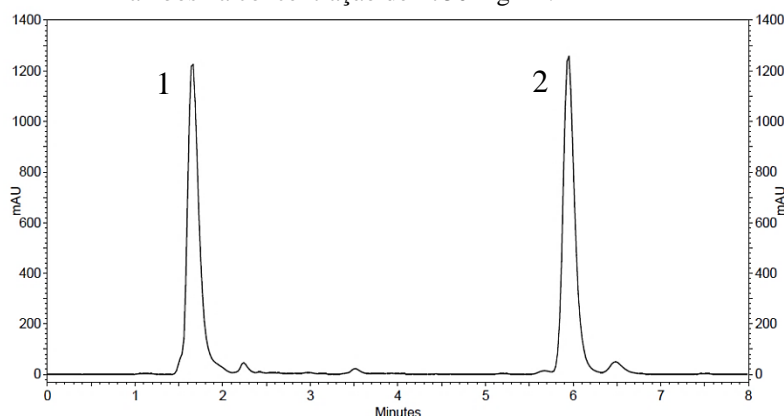
Nas análises do *pool* de urina de ratos não expostos não foram observados interferentes nas regiões de eluição dos analitos, podendo ser visualizado somente o pico de CR e AH endógenos (Figura 17). O tempo médio de retenção da CR foi de 1,75 min e do AH foi de 6,25 min (Figura 18). A identificação dos metabólitos foi confirmada através da comparação dos tempos de retenção dos analitos em matriz com os adquiridos em soluções padrão, preparadas em solvente.

Figura 17 - Cromatograma do *pool* de urina de animais não expostos ocupacionalmente ao TOL.

Fonte: Do Autor.

Nota: A análise se processou nas condições cromatográficas apresentadas no item 4.1.3.2. 1 - CR; 2 - AH.

Figura 18 - Cromatograma de amostra de urina fortificada com AH e CR, ambos na concentração de 1750 mg L⁻¹.



Fonte: Do Autor.

Nota: As condições cromatográficas em que a corrida se procedeu estão disponíveis no item 4.1.3.2. 1 - CR (TR: 1,75 min); 2 - AH (TR: 6,25 min).

Através de injeções de fase móvel, após corridas de soluções padrão preparadas na concentração de 5000 mg L⁻¹, foi possível visualizar os picos correspondentes à CR e ao AH, porém os sinais gerados representaram apenas 0,53 e 0,38%, respectivamente, em relação ao LIQ. Portanto, não houve efeito residual considerável, segundo o guia de validação adotado (FDA, 2001).

Soluções de CR e AH nas concentrações de 750 e 3750 mg L⁻¹, em urina - avaliadas quanto a sua estabilidade pós-processamento (PP), após ciclos de congelamento (CC) e de longa duração (LD) - mantiveram-se estáveis sob as condições testadas. Os resultados das médias dos desvios em relação às amostras recém preparadas estão apresentados na Tabela 6:

Tabela 6 - Estudos de estabilidade de soluções padrão de AH e CR em urina.

	PP ⁱ (%)	CC ⁱⁱ (%)	LD ⁱⁱⁱ (%)
AH	-0,94	6,5	12,65
CR	-2,08	2,35	3,68

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Estabilidade pós-processamento.

ⁱⁱ Estabilidade mediante ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento.

ⁱⁱⁱ Estabilidade de longa duração (sete dias).

Os resultados dos estudos de estabilidade dos analitos estão expressos pelo erro relativo, no momento da análise, em relação à concentração determinada inicialmente.

Para a determinação da eficiência do procedimento de extração (recuperação), amostras enriquecidas com soluções padrão de CR e AH (750, 1750 e 3750 mg L⁻¹ de urina) foram preparadas como o descrito no item 4.1.3.3. Os sinais analíticos de CR e AH (subtraídos dos endógenos) dessas amostras foram comparados com padrões nas mesmas concentrações, porém

preparados em água ultrapurificada. Os valores de recuperação calculados encontraram-se na faixa de 101 a 106%. Os resultados dos testes de recuperação foram semelhantes aos obtidos no estudo de Antunes, Patuzzi e Linden (2008), que obtiveram entre 96 e 108%.

A Tabela 7 mostra os dados referentes aos limites de quantificação, precisão e exatidão interdia e intradia do método de determinação dos analitos.

Tabela 7 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de AH e CR em urina: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.

		AH (mg L ⁻¹)			CR (mg L ⁻¹)		
		250			250		
LIQ	Média (n=6)	245,44			243,45		
	CV% ⁱ	7,83			8,14		
	%E ⁱⁱ	-1,82			-2,62		
		750	1750	3750	750	1750	3750
Dia 1	Média (n=5)	732,79	1720,0	3901,1	660,7	1964,5	3960,5
	CV% ⁱ	8,67	2,89	1,21	9,19	6,28	2,14
	%E ⁱⁱ	-2,29	-1,71	4,03	-11,90	12,26	5,61
Dia 2	Média (n=5)	769,23	1720,1	3255,2	694,89	1919,2	3880,1
	CV% ⁱ	2,32	3,64	1,03	5,91	3,46	8,87
	%E ⁱⁱ	2,56	-1,71	-13,20	-7,35	9,68	3,47
Dia 3	Média (n=5)	815,2	1728,1	3251,9	760,17	1862,0	4008,2
	CV% ⁱ	2,71	2,13	1,23	8,78	3,18	8,89
	%E ⁱⁱ	8,69	-1,25	-13,28	1,35	6,399	6,89
Dias 1 - 3	Média (n=15)	772,4	1722,7	3469,4	705,2	1915,3	3949,6
	CV% ⁱ	4,57	2,90	1,16	7,90	4,31	6,63
	%E ⁱⁱ	2,30	-1,55	-7,48	-5,97	9,44	5,33

Fonte: Do Autor.

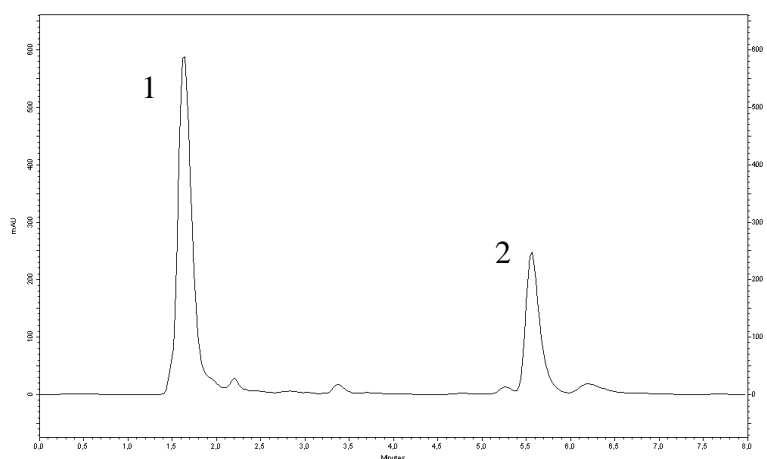
Notas: ⁱ Precisão (CV%=[Desvio Padrão/Média] x 100).

ⁱⁱ Exatidão. Calculada através da equação que expressa a inexatidão do método:

$$\%E = [(Concentração\ média\ experimental / Concentração\ Teórica) \times 100] - 100.$$

Antunes, Patuzzi e Linden, em 2008, obtiveram um LIQ calculado de $0,18 \text{ mg L}^{-1}$ para o AH e de, $0,33 \text{ mg L}^{-1}$ para a CR, todavia, o ponto mais baixo da curva analítica (preparada em solvente) foi de 250 mg L^{-1} . No presente estudo, mesmo com os calibradores sendo preparados com sobreposição de matriz, obteve-se um LIQ de 250 mg L^{-1} (Figura 19) para ambos os analitos.

Figura 19 - Cromatograma de amostra de urina fortificada com AH e CR, ambos na concentração de 250 mg L^{-1} (LIQ).



Fonte: Do Autor.

Nota: A análise se processou nas condições cromatográficas apresentadas no item 4.1.3.2. 1 - CR; 2 - AH.

Na metodologia validada por Antunes, Patuzzi e Linden (2008), o intervalo de concentração abrangido pela curva analítica foi de 250 a 3000 mg L^{-1} , enquanto que neste trabalho validou-se uma faixa de concentração de 250 a 5000 mg L^{-1} , importante para a determinação de AH e CR na urina dos animais em estudo. Mesmo com a extensão do intervalo de concentração abrangido pela curva analítica o método manteve-se preciso e exato, com resultados inferiores a 15%, tanto nos ensaios intradia quanto interdia (Tabela 7).

5.1.3 Análise de diazepam e nordiazepam em plasma por CLAE-DAD

A metodologia analítica de determinação de DZP e NOR desenvolvida por Freire et al. (2005) pôde ser aplicada sem modificações na técnica de extração e separação cromatográfica. Nesse estudo, os autores avaliaram duas técnicas de extração, a ELL e a SPE, e ambas obtiveram desempenhos satisfatórios. Contudo, a ELL foi escolhida para o presente estudo por sua relativa facilidade operacional e seu baixo custo associado. Como a metodologia fora desenvolvida nas mesmas condições atuais (mesmo laboratório, equipamentos e coluna cromatográfica), foi executado apenas uma validação parcial.

A linearidade do método na faixa de concentração de 50 a 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi avaliada através do estabelecimento da correlação entre a razão dos sinais analíticos obtidos (DZP/NIT e NOR/NIT) pelas concentrações nominais de cada ponto da curva analítica. Através dos resultados apresentados na Tabela 8, pôde-se inferir que o método manteve-se linear (Figuras 20 e 21).

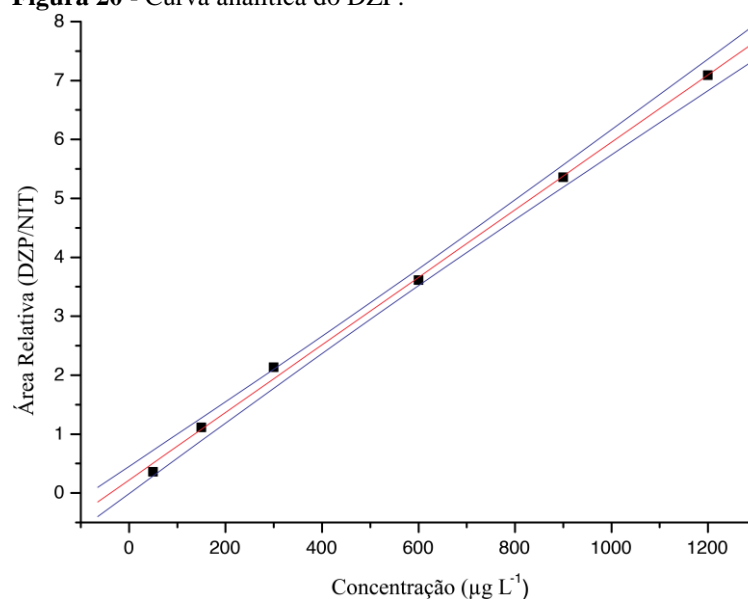
Tabela 8 - Resultados da linearidade do método de determinação de NOR e DZP em plasma.

	NOR	DZP
Intervalo linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50 - 1200	50 - 1200
$a^i \pm EP_a^{ii}$ (n=3)	$0,0038 \pm 8,89 \times 10^{-5}$	$0,0057 \pm 1,23 \times 10^{-4}$
$b^i \pm EP_b^{ii}$ (n=3)	$-0,0822 \pm 5,99 \times 10^{-2}$	$0,2212 \pm 8,30 \times 10^{-2}$
r^2 (n=3)	0,9979	0,9982

Fonte: Do Autor.

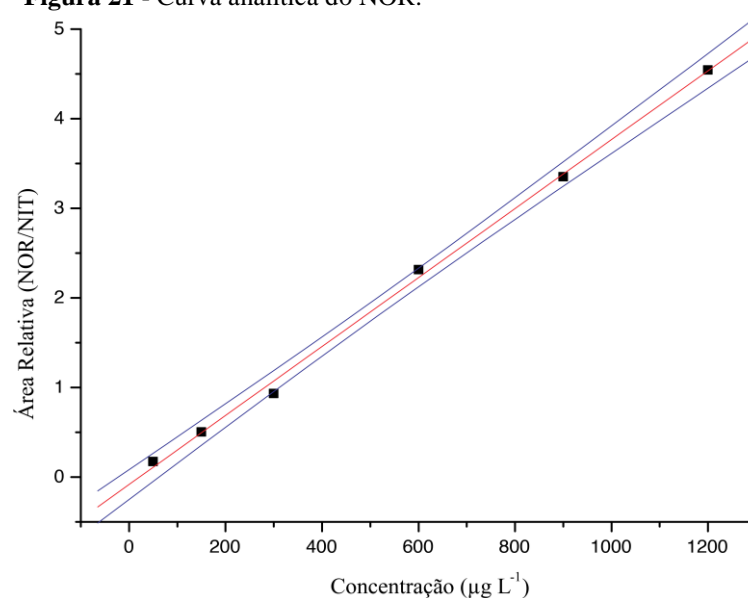
Notas: ⁱ Equação de regressão linear: $y = ax + b$, em que a representa a inclinação da reta e b o intercepto no eixo das ordenadas. O coeficiente de determinação é dado por r^2 .

ⁱⁱ Erro Padrão da média: $EP = \pm DP / \sqrt{n}$.

Figura 20 - Curva analítica do DZP.

Fonte: Do Autor.

Nota: A linha em vermelho representa a reta estimada na regressão linear e as linhas em azul são os IC 95% superior e inferior.

Figura 21 - Curva analítica do NOR.

Fonte: Do Autor.

Nota: A linha em vermelho representa a reta estimada na regressão linear e as linhas em azul são os IC 95% superior e inferior.

Em estudos farmacocinéticos realizados em ratos, como o executado por Walker et al. (1998), a concentração de DZP no estado de equilíbrio, após doses do fármaco a 10 mg Kg^{-1} , foi da ordem de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Nesse mesmo trabalho, o limite de quantificação foi de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. Sendo assim, o intervalo de concentração considerado na curva analítica ($50 - 1200 \mu\text{g L}^{-1}$) e o limite de quantificação do método atendem às determinações pretendidas.

Para a determinação da eficiência do procedimento de extração (recuperação), amostras enriquecidas com soluções padrão de DZP e NOR (150, 600 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ de plasma) foram preparadas como o descrito no item 4.1.4.3. Os sinais analíticos de DZP e NOR dessas amostras foram comparados com padrões não extraídos (soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco). Os valores de recuperação calculados encontraram-se na faixa de 87 a 93% para DZP, e de 76 a 84%, para NOR. No estudo conduzido por Freire et al. (2005), a recuperação relativa média do DZP foi de 95,7% e do NOR foi 97,7%, contudo, no estudo de Borges et al. (2009), os valores de recuperação para tais analitos foram de 66,0 e 76,2%.

Soluções de DZP e NOR nas concentrações de 150 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$, em plasma - avaliadas quanto à sua estabilidade pós processamento (PP) e após ciclos de congelamento (CC) - mantiveram-se estáveis sob as condições testadas. Os resultados das médias dos desvios em relação às amostras recém preparadas estão compilados na Tabela 9:

Tabela 9 - Estudos de estabilidade de soluções padrão de NOR e DZP em plasma.

	PP ⁱ (%)	CC ⁱⁱ (%)
NOR	6,3	2,7
DZP	8,5	3,3

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Estabilidade pós-processamento.

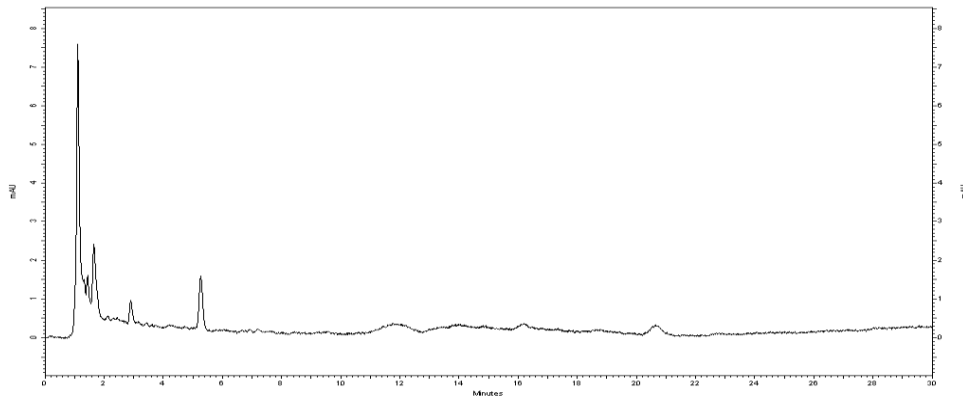
ⁱⁱ Estabilidade mediante ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento.

Os resultados dos estudos de estabilidade dos analitos estão expressos pelo erro relativo, no momento da análise, em relação à concentração determinada inicialmente.

Com os resultados satisfatórios acerca da estabilidade dos analitos, foi possível o armazenamento das amostras de plasma por até três dias, sem perdas significativas de DZP e NOR.

Nas análises do *pool* de plasma não foram observados interferentes com áreas significativas nas regiões de eluição dos analitos (Figura 22). O tempo médio de retenção do NOR foi de 10,65 minutos e do DZP foi de 17,86 minutos (Figura 23). A identificação foi confirmada através da comparação dos seus tempos de retenção com padrões preparados em solvente (Figura 24).

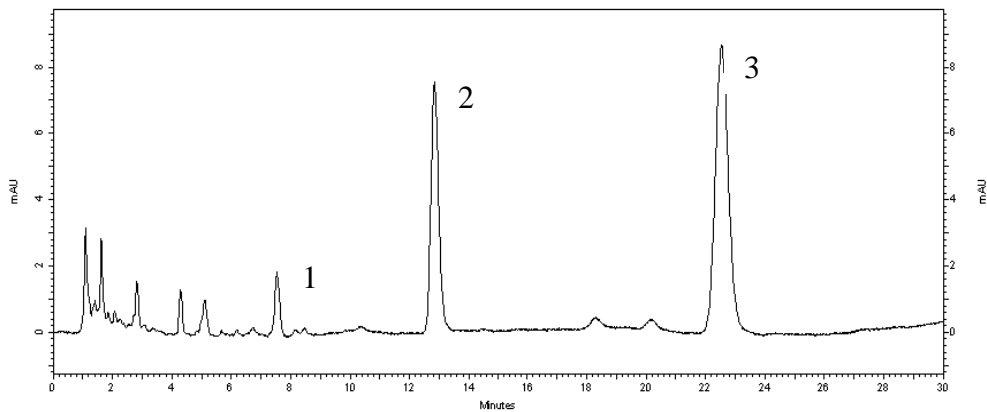
Figura 22 - Cromatograma do *pool* de plasma com ausência de interferentes nas regiões de eluição dos analitos.



Fonte: Do Autor.

Nota: Os parâmetros da análise cromatográfica e o procedimento de extração, foram conforme o método descrito no item 4.1.4.

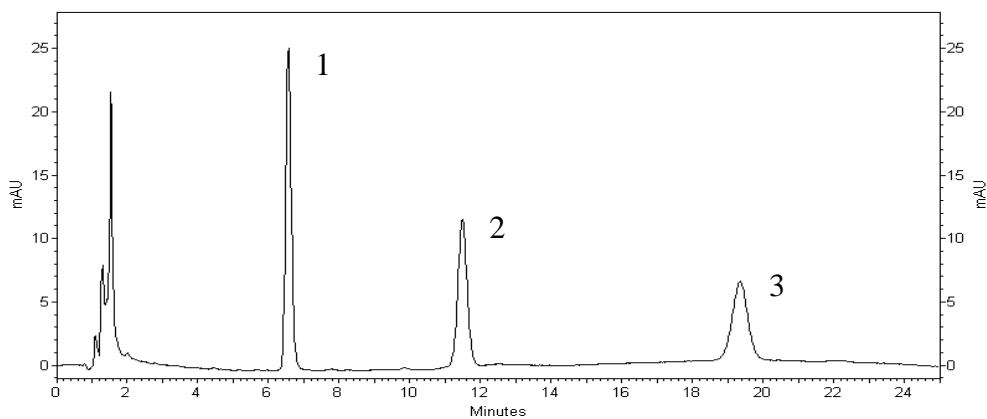
Figura 23 - Cromatograma de amostra de plasma fortificado com NOR e DZP, ambos na concentração de $600 \mu\text{g L}^{-1}$ e NIT, na concentração de $2500 \mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Do Autor.

Notas: Os parâmetros da análise cromatográfica e o procedimento de extração, foram conforme o método descrito no item 4.1.4. 1 - NIT; 2 - NOR; 3 - DZP.

Figura 24 - Cromatograma de solução padrão contendo NOR e DZP, na concentração de $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ de metanol e NIT, na concentração de $2500 \mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Do Autor.

Notas: Os parâmetros cromatográficos foram conforme o descrito no item 4.1.4.2. 1 - NIT; 2 - NOR; 3 - DZP.

Através de injeções de fase móvel após corridas de soluções padrão preparadas na concentração de 1200 µg L⁻¹ obteve-se ausência de efeito residual.

A Tabela 10 mostra os dados referentes aos limites de quantificação, precisão e exatidão interdia e intradia do método de determinação dos analitos.

Tabela 10 - Resultados dos parâmetros de validação analítica da metodologia de determinação de NOR e DZP em plasma: LIQ, precisão e exatidão interdia e intradia.

		NOR (µg L ⁻¹)			DZP (µg L ⁻¹)		
		50			50		
LIQ	Média (n=6)	58,6			58,3		
	CV% ⁱ	3,1			13,8		
	%E ⁱⁱ	17,1			16,6		
		150	600	900	150	600	900
Dia 1	Média (n=5)	153,0	557,7	990,4	151,0	582,0	953,0
	CV% ⁱ	7,2	6,6	11,1	11,1	4,29	9,0
	%E ⁱⁱ	2,0	-7,0	10,0	0,7	-3,0	5,9
Dia 2	Média (n=5)	149,0	532,2	859,3	135,8	558,2	924,6
	CV% ⁱ	6,0	11,5	9,9	5,7	8,1	13,5
	%E ⁱⁱ	-0,7	-11,3	-4,5	-9,5	-7,0	2,7
Dia 3	Média (n=5)	156,0	642,5	846,3	139,5	610,3	861,6
	CV% ⁱ	6,8	7,4	7,7	7,3	12,3	7,7
	%E ⁱⁱ	4,0	7,1	-6,0	-7,0	1,7	-4,2
Dias 1 - 3	Média (n=15)	152,7	577,5	898,7	142,1	583,5	913,1
	CV% ⁱ	6,7	8,5	9,6	8	8,23	10,1
	%E ⁱⁱ	1,8	-3,7	-0,2	-5,3	-2,8	1,5

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ Precisão (CV%=[Desvio Padrão/Média] x 100).

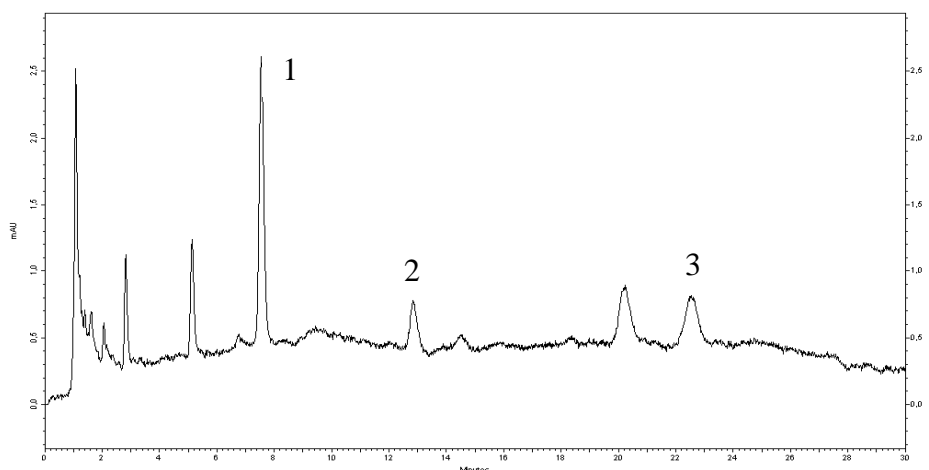
ⁱⁱ Exatidão. Calculada através da equação que expressa a inexatidão do método:

$$\%E = [(Concentração\ média\ experimental / Concentração\ Teórica) \times 100] - 100.$$

Assim como em Freire et al. (2005) e Borges et al. (2009), o limite de quantificação para DZP e NOR foi de 50 µg L⁻¹ (Figura 25), com precisão e exatidão adequadas (Tabela 10). Da

mesma maneira que nos trabalhos citados, a precisão e exatidão nas análises de plasma fortificado nas concentrações de 150, 600 e 900 $\mu\text{g L}^{-1}$, em corridas no mesmo dia e em dias diferentes, se manteve dentro dos limites preconizados no item 4.1.5.4. Portanto, com a revalidação da metodologia desenvolvida por Freire et al. (2005), DZP e NOR puderam ser quantificados em plasma de ratos.

Figura 25 - Cromatograma de amostra de plasma fortificado com NOR e DZP, ambos na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LIQ) e NIT, na concentração de 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Do Autor.

Notas: Os parâmetros da análise cromatográfica e o procedimento de extração, foram conforme o método descrito no item 4.1.4. 1 - NIT; 2 - NOR; 3 - DZP.

5.2 CÂMARA DE EXPOSIÇÃO

A Tabela 11 mostra os resultados individuais obtidos nas amostragens realizadas, para a concentração pretendida de 75 mg m^{-3} . Considerando todas as amostras, as médias, desvios-padrão, CV% e exatidão foram respectivamente $78,5 \pm 4,1 \text{ mg m}^{-3}$, 5,2 e 4,7 para as portas do plano inferior e de $77,8 \pm 4,2 \text{ mg m}^{-3}$, 5,4 e 3,7 para as portas do plano superior.

Pela comparação das médias de concentração de TOL obtidas nas amostras coletadas nos planos superior e inferior, de acordo com o teste *t* de Student ($t = -0,2674$; $p = 0,7946$), foi possível observar que não se formou gradiente de concentração no plano vertical da câmara.

Tabela 11 - Resultados da análise das concentrações de TOL nas portas da câmara de exposição.

	1ª Hora		3ª Hora		6ª Hora	
	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
Plano coleta						
Amostra 1 (mg m^{-3})	77,0	76,0	77,8	82,0	74,2	77,7
Amostra 2 (mg m^{-3})	74,6	69,7	81,6	79,8	85,5	81,7
Média (mg m^{-3})	74,3		80,3		79,8	
CV%	4,4		2,4		6,2	
Exatidão	-0,9		7,1		6,5	

Fonte: Do Autor.

Notas: $CV\% = [\text{Desvio Padrão} / \text{Média}] \times 100$

Exatidão = $[(\text{Concentração média experimental} / \text{TLVTWA}) \times 100] - 100$.

O sistema de geração de atmosfera experimental apresentou-se estável durante as seis horas de funcionamento, exibindo desvios inferiores a 10% em relação a concentração configurada no equipamento (Tabela 11). Para garantia da estabilidade ao longo das seis semanas de exposição, análises semanais de pontos superiores e inferiores da câmara foram realizadas obtendo-se uma média, desvio padrão, CV% e exatidão de $85,3 \pm 16,3 \text{ mg m}^{-3}$, 18,9 e 14,6, respectivamente.

Portanto, frente aos resultados obtidos, pode-se considerar que o equipamento se mostrou adequado para manter a homogeneidade e a estabilidade da concentração de TOL durante o tempo do experimento. Além de evitar a absorção do solvente por outras vias, essa forma de exposição tem como vantagens a utilização de menor quantidade de solvente e o maior controle sobre a exposição, resultando em maior uniformidade (DORATO, 1990; GREENWOOD, 2006).

5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO AO TOLUENO

Os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao TOL e a sua influência no metabolismo de fármacos já foram descritos na literatura, contudo, estudos relativos aos possíveis efeitos de fármacos na eliminação de SOV são escassos. Desse modo, através da execução de um protocolo experimental de exposição subcrônica ao TOL a um *TLV-TWA* de 20 ppm (75,4 mg m⁻³), 6 horas por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, nas condições de uma exposição ocupacional, buscou-se avaliar a influência do DZP, quando administrado diariamente, na excreção dos produtos de biotransformação do TOL em ratos.

Segundo Dorato (1990), estudos subcrônicos de exposição por inalação devem ser conduzidos por um período de 30 a 180 dias com exposições diárias de 1 a 6 horas, durante 5 a 7 dias por semana. Wang e Nakajima (1991), ao avaliar a influência do etanol e do fenobarbital na cinética de eliminação do TOL, consideraram um período de 3 semanas como suficiente para alterar o sistema enzimático de biotransformação. Desse modo, com o ciclo total de exposições de 6 semanas, baseado no trabalho executado por Cardoso (2012), pretendeu-se assegurar ao menos um *turnover* completo da(s) enzima(s) de interesse, cuja extensão exata não é conhecida, além de simular um período de exposição múltipla, que é a situação real, no ambiente ocupacional.

O estresse sofrido pelos animais também é um ponto a ser considerado, pois fatores físicos, fisiológicos ou emocionais podem alterar a homeostase. Estudos demonstraram que a contenção de ratos e camundongos em câmaras de exposição do tipo NOES pode causar alterações bioquímicas (p. ex.: depleção de glutatona hepática), fisiológicas e comportamentais, porém, a partir do 14º dia de exposição estas alterações se tornam insignificantes, ocorrendo assim, a remissão completa do estresse (NARCISO et al. 2003). Em particular, a depleção de glutatona hepática deixa de ser significativa a partir do 5º dia de exposição (FECHTER; NELSON-MILLER; GEARHART, 2008).

Na prática clínica, o DZP é frequentemente utilizado como hipnótico e sedativo com duração de tratamento em média de 60 dias a uma posologia de 1 comprimido de 10 mg por dia (FIRMINO et al. 2012). É reportado também na literatura o seu uso em crises epiléticas a uma dosagem de 10 mg (0,2 mg Kg⁻¹). Segundo Walker et al. (1998), devido diferenças na farmacocinética, doses de 10 e 20 mg de DZP por kg de peso administradas a ratos equivalem a aproximadamente 0,2 e 0,3 mg kg⁻¹, respectivamente, em humanos. Sendo assim, a dosagem

adotada de DZP de 10 mg Kg^{-1} , administrada aos animais, pode ser comparada ao preconizado em humanos.

As determinações de DZP e NOR no plasma dos animais foram realizadas para fins de monitoramento terapêutico e confirmação da ingestão do fármaco. De acordo com Monteiro, Carlos e Pinto (2008), quando administrado intraperitonealmente em ratos, o DZP é rapidamente absorvido e, em aproximadamente 10 min, atinge uma concentração máxima no plasma e no fluido cérebro-espinhal acima de 500 e $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, mantendo-se elevada até uma hora depois, caindo posteriormente a níveis muito baixos com redução gradativa dos efeitos clínicos. Já segundo Walker et al. (1998), a meia-vida plasmática do DZP é substancialmente menor em ratos do que em humanos, portanto, devido às amostras terem sido coletadas no vale de concentração plasmática, ou seja, no período que antecede a próxima administração do fármaco, a variabilidade farmacocinética interespecies e o grande intervalo de administração entre uma dose e outra, os teores plasmáticos de DZP encontrados (Tabela 12) foram relativamente mais baixos quando comparados aos níveis plasmáticos em humanos (KLOTZ; ANTONIN; BIECK, 1976).

Critérios de escolha relativos ao período e tempo de duração da coleta de amostras são essenciais no monitoramento biológico. Em humanos, a urina é geralmente coletada no final de uma jornada de trabalho (BRASIL, 1994; ACGIH, 2010). Desse modo, no protocolo utilizado neste estudo, toda a urina excretada durante as 16 h que sucederam as exposições foi coletada.

A média dos níveis urinários de AH nos animais do grupo CTRL (Tabela 12), igual a $0,21 \text{ g g}^{-1} \text{ CR}$, estão de acordo com aqueles encontrados na literatura. Wetmore et al. (2008), em estudo realizado com camundongos, obtiveram uma concentração de AH aproximadamente de $0,3 \text{ g g}^{-1} \text{ CR}$. Em relação à comparação entre grupos, não foram observadas diferenças significativas dos níveis de AH entre os grupos CTRL e GTOL ($p = 0,2222$), assim como entre os grupos CTRL e GTOL/DZP ($p = 0,1508$). Conseqüentemente, os resultados encontrados nos grupos GTOL e GTOL/DZP também foram semelhantes ($p = 0,1508$).

Como já se sabe, o AH pode ser encontrado em indivíduos não exposto ao TOL na ordem de $\text{g g}^{-1} \text{ CR}$, provindo de várias fontes (catabolismo de proteínas, metabolismo do ácido benzoico presente em algumas frutas etc), o que o torna válido somente em exposições relativamente intensas (FUSTINONI et al. 2000). Em estudos conduzidos por Cosnier et al. (2013), não se observou elevações significativas dos níveis de AH após a exposição de concentrações de TOL abaixo de 20 ppm. Portanto, mediante os resultados obtidos, não foi possível afirmar que exista influência do DZP na excreção do AH devido à sua inespecificidade

como BI e a falta de sensibilidade em baixas concentrações de exposição, confirmada no presente estudo.

Assim como o AH, o *o*-C também pode ser encontrado na urina de indivíduos não expostos ao TOL, porém a sua utilização como BI somente não é indicada em exposições muito baixas (próximas de 2 ppm) (INOUE et al. 2008; COSNIER et al. 2013). Pela análise da urina dos ratos não expostos ao TOL, grupos CTRL e GDZP, ambos apresentaram a mesma concentração de *o*-C, 0,05 mg g⁻¹ CR (Tabela 12). Tais valores são compatíveis com os encontrados em humanos, uma vez que a biotransformação e a cinética de eliminação do TOL, nas duas espécies, são muito semelhantes (COSNIER et al. 2013). Çok, Dagdelen e Gökçe, em 2003, determinando os níveis de AH e *o*-C em trabalhadores, obtiveram para o grupo controle ($n = 54$) uma concentração de *o*-C na ordem de 0,012 mg g⁻¹ CR. Já Fustinoni et al. (2005), encontraram valores basais de *o*-C na concentração de 0,014 mg L⁻¹ (os autores não efetuaram a correção pela depuração da CR).

A utilização do *o*-C urinário como BI de exposição ao TOL vem sendo recomendada devido às suas vantagens em relação ao AH (ACGIH, 2010). Em altos níveis de exposição, o *o*-C atua de forma similar ao AH como BI, entretanto, em baixas concentrações do solvente (abaixo de 50 ppm), este apresenta-se mais sensível à exposição (TRUCHON; TARDIF; BRODEUR, 1999). No presente trabalho, após a exposição de ratos ao TOL na concentração de 20 ppm (TLV-TWA) foi possível verificar um aumento significativo nos níveis de *o*-C quando comparado com os animais do grupo CTRL ($p = 0,0079$). A média de concentração encontrada para o grupo GTOL foi de 0,19 mg g⁻¹ CR (Tabela 12), ao passo que a ACGIH recomenda um BEI de 0,3 mg g⁻¹ CR, o que está relacionado com um TLV-TWA de 20 ppm.

Tabela 12 - Resultados das determinações dos bioindicadores de exposição ao TOL e das concentrações plasmáticas de DZP e NOR em ratos.

	CTRL ⁱ	GTOL ⁱ	GTOL/DZP ⁱ	GDZP ⁱ
AH (g g ⁻¹ CR)	0,22 0,21 ± 0,02 (0,16 - 0,25)	0,23 0,23 ± 0,01 (0,20 - 0,26)	0,28 0,25 ± 0,04 (0,15 - 0,36)	0,24 0,26 ± 0,02 (0,21 - 0,32)
<i>o</i> -C (mg g ⁻¹ CR)	0,05 0,05 ± 0,01 (0,03 - 0,07)	0,22 0,19 ± 0,03* (0,12 - 0,26)	0,11 0,11 ± 0,01** (0,08 - 0,15)	0,05 0,05 ± 0,01 (0,03 - 0,07)
DZP (µg L ⁻¹)	ND ⁱⁱ	ND ⁱⁱ	66,07 64,14 ± 5,34 (49,31 - 78,97)	81,93 86,01 ± 10,66 (56,42 - 115,6)
NOR (µg L ⁻¹)	ND ⁱⁱ	ND ⁱⁱ	68,14 73,85 ± 7,67 (52,56 - 95,15)	85,04 79,45 ± 8,38 (56,18 - 102,7)
DZP+NOR (µg L ⁻¹)	ND ⁱⁱ	ND ⁱⁱ	134,2 140,5 ± 11,5 (108,5 - 172,4)	168,9 165,5 ± 10,80 (135,5 - 195,4)

Fonte: Do Autor.

Notas: ⁱ $n = 5$. Resultados expressos pela mediana, média ± EP e IC 95%. Os resultados significativamente diferentes estão destacados em preto.

ⁱⁱ Não detectado (ND).

* $p < 0,05$ vs. grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

** $p < 0,05$ vs. grupo GTOL (Teste de Mann-Whitney).

Os resultados de *o*-C obtidos do grupo GTOL foram comparados ao do grupo GTOL/DZP, o qual ratos foram tratados com DZP (10 mg Kg⁻¹) e expostos ao TOL (20 ppm). Pela comparação constatou-se que os dois grupos não são estatisticamente semelhantes ($p = 0,0317$). Dessa forma, verificou-se que o grupo GTOL excretou uma quantidade de cerca de 1,66 vezes maior de *o*-C, em relação ao grupo GTOL/DZP.

As enzimas do CYP são as principais envolvidas na biotransformação de fármacos, poluentes ambientais e outros xenobióticos (HASLER et al. 1999). O metabolismo do TOL em fígado de humanos é predominantemente carregado pela CYP2E1, seguido pelas CYP2B6, 2C8, 1A2 e 1A1, para a formação do álcool benzílico. As CYP2B6 e CYP2E1 catalisam a formação de *p*-C, enquanto que a CYP1A2 é responsável pela formação de *o*- e *p*-C. Em estudos realizados em células hepáticas humanas, as isoenzimas CYP2E1, 2B6, 1A2 e 2C8 mediarão a formação de álcool benzílico, assim como a CYP 2C8 esteve envolvida na formação de *o*- e *p*-C. No mesmo estudo, a formação de *o*- e *p*-C teve como principais isoenzimas envolvidas as CYP1A2, 2B6 e 2E1 (NAKAJIMA et al. 1997).

A via de metabolização do DZP envolve uma variedade de CYPs, mas basicamente as isoenzimas CYP2B6, 2C8, 2C9, 3A4 e 3A5 são capazes de oxidar DZP, TZP e NOR. Predominantemente, as isoformas CYP2C e 2B6 estão relacionadas às reações de *N*-hidroxilação enquanto que as CYP3A catalisam a C3-hidroxilação do DZP (YANG et al. 1998; ACIKGÖZ et al. 2009). Segundo Yang et al. (1998), as CYP 2E1 e 1A2 exibem fraca atividade na oxidação do NOR e TZP, porém mensurável.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que uma possível inibição enzimática envolvendo as isoformas do CYP (CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1 e CYP1A2), presentes na biotransformação do DZP e do TOL e relacionadas com a formação de *o*-C, possa ser responsável pelo decréscimo na excreção desse metabólito na urina. Todavia, são necessários estudos com um maior número de amostras e em diferentes grupos experimentais, principalmente humanos. Ainda assim, os inéditos resultados obtidos podem ser informações úteis na avaliação da exposição, por meio do biomonitoramento da exposição a esse solvente, amplamente utilizado no ambiente de trabalho.

Quando comparados os níveis de AH e *o*-C urinários dos grupos CTRL e GDZP (Tabela 12), verificou-se que não houve diferenças significativas entre eles ($p = 0,0952$ e $p = 1,000$, respectivamente), mostrando que as vias responsáveis pela formação dos conteúdos endógenos desses metabólitos não foram afetadas pelo DZP. Dessa maneira, sugere-se que tal influência é predominantemente relacionada à biotransformação do TOL.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a) O método utilizado para a determinação de *o*-C pela técnica de ELL, seguida pela separação e detecção no CG-EM, foi adequado para a análise desse bioindicador urinário, uma vez que é linear, preciso, exato e seletivo;
- b) O método utilizado para a determinação de AH e CR por CLAE-DAD apresentou resultados satisfatórios na validação analítica e, portanto, foi adequado para as determinações requeridas no presente estudo;
- c) A técnica de extração ELL aplicada a amostras de plasma contendo DZP e NOR, seguida pela separação e quantificação desses analitos por CLAE-DAD, pôde ser aplicada e validada parcialmente, sendo o método linear, preciso, exato e seletivo;
- d) Com os métodos, devidamente validados, de determinação de DZP e seu metabólito, NOR, dos produtos de biotransformação do TOL (AH e *o*-C), assim como da CR, foi possível determinar as concentrações desses analitos em animais expostos, segundo o protocolo experimental de exposição;
- e) A exposição inalatória ao TOL na concentração de 20 ppm (TLV-TWA), 6 h por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, de animais que receberam concomitantemente DZP (10 mg Kg⁻¹) (grupo GTOL/DZP) demonstrou que, por não haver diferenças significativas entre os níveis de AH urinário nos grupos estudados, não foi possível afirmar que exista influência do DZP na excreção do AH devido à sua inespecificidade como BI e a falta de sensibilidade em baixas concentrações de exposição, confirmada no presente estudo;
- f) A exposição inalatória ao TOL na concentração de 20 ppm (TLV-TWA), 6 h por dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, de animais que receberam DZP (10 mg Kg⁻¹) (grupo GTOL/DZP) demonstrou que o diazepam influencia na excreção de *o*-C, reduzindo seus níveis urinários, tendo como hipótese a inibição de isoformas do CYP (CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1 e CYP1A2) envolvidas no metabolismo oxidativo do TOL;
- g) Os inéditos resultados obtidos neste trabalho podem ser informações úteis na avaliação da exposição ocupacional ao tolueno, realizada por meio do biomonitoramento da exposição a esse solvente.

REFERÊNCIAS

- ACIKGÖZ, A. et al. Two compartment model of diazepam biotransformation in an organotypical culture of primary human hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 234, n. 2, p. 179–191, 2009.
- AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 20, n. 46, p. 46–58, 1994.
- ALESSIO, L.; APOSTOLI, P.; CRIPPA, M. Influence of individual factors and personal habits on the levels of biological indicators of exposure. **Toxicology Letters**, v. 77, n. 1-3, p. 93–103, 1995.
- ALVAREZ-LEITE, E. M. Solventes orgânicos. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2014. cap. 3, p. 277–322.
- AMERICAN OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). **TLVs® and BEIs®: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices**. Cincinnati, 2010.
- ANTUNES, M. V.; NIEDERAUER, C. G.; LINDEN, R. Development, validation and clinical evaluation of a dried urine spot method for determination of hippuric acid and creatinine. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 13-14, p. 1276–1280, 2013.
- ANTUNES, M. V.; PATUZZI, A. L. M.; LINDEN, R. Determinação simultânea de creatinina e indicadores biológicos de exposição ao tolueno, estireno e xilenos em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1865–1868, 2008.
- BERLIN, A.; YODAIKEN, R. E.; LOGAN, D. C. International seminar on the assessment of toxic agents at the workplace roles of ambient and biological monitoring, Luxembourg, 8-12 December, 1980. Summary report. **International archives of occupational and environmental health**, v. 50, n. 2, p. 197–207, 1982.
- BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. cap. 8, p. 203–270.
- BORGES, K. B. et al. Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid-liquid and solid-phase extractions in human plasma. **Talanta**, v. 78, n.

1, p. 233–241, 2009.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, Portaria 24, de 29 de dezembro de 1994, **Diário Oficial da União**, Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, Portaria 14, de 20 de dezembro de 1995, **Diário Oficial da União**, Brasília, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, 17 de maio de 2012. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 30 abr. 2014.

BRUCKNER, J. V.; ANAND, S. S.; WARREN, D. A. Toxic Effects of Solvents and Vapors. In: KLAASSEN, C. D.; ANDUR, M. O.; DOULL, J. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 2008. cap. 24, p. 981- 1052.

BULCÃO, R. et al. Quantificação simultânea de indicadores biológicos de exposição a solventes orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1343–1348, 2008.

CARDOSO, J. L. C. Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A , CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais. Biblioteca Virtual de Teses e Dissertações, Ribeirão Preto, 91f., 2012. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-10012013-155615/pt-br.php>>. Acesso em: 20 out. 2014.

CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO SOBRE DROGAS PSICOTRÓPICAS (CEBRID). **II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005**. São Paulo, 2006.

CHARNEY, D. S.; MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Hipnóticos e Sedativos. In: GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap. 17, p. 303-324.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191–219, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na

análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COK, I.; DAGDELEN, A.; GÖKÇE, E. Determination of urinary hippuric acid and o-cresol levels as biological indicators of toluene exposure in shoe-workers and glue sniffers. **Biomarkers**, v. 8, n. 2, p. 119–127, 2003.

COLLINS, C. H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. cap. 1, p. 17–45.

COSNIER, F. et al. Biomarkers of toluene exposure in rats: mercapturic acids versus traditional indicators (urinary hippuric acid and o-cresol and blood toluene). **Xenobiotica**, v. 43, n. 8, p. 651–660, 2013.

COSNIER, F. et al. Impact of coexposure on toluene biomarkers in rats. **Xenobiotica**, v. 44, n. 3, p. 217–228, 2014.

DE PAIVA, M. J. N. et al. Analysis of ortho-cresol in urine by solid phase microextraction-capillary gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 1034–1039, 2007.

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.

DORATO, M. A. Overview of inhalation toxicology. **Environmental health perspectives**, v. 85, p. 163–70, 1990.

DØSSING, M. et al. Effects of ethanol, cimetidine and propranolol on toluene metabolism in man. **Occupational and environmental health**, v. 54, p. 309–315, 1984.

ERNSTGÅRD, L. et al. Toxicokinetic interactions between orally ingested chlorzoxazone and inhaled acetone or toluene in male volunteers. **Toxicological Sciences**, v. 48, n. 2, p. 189–196, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry- Bioanalytical Method Validation**. May, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Valium - FDA prescribing information, side effects and uses**. Disponível em: <www.drugs.com/pro/valium.html>. Acesso em: 19

jun. 2015.

FECHTER, L. D.; NELSON-MILLER, A.; GEARHART, C. Depletion of liver glutathione levels in rats: a potential confound of nose-only inhalation. **Inhalation toxicology**, v. 20, p. 885–890, 2008.

FIRMINO, K. F. et al. De. Utilização de benzodiazepínicos no Serviço Municipal de Saúde de Coronel Fabriciano, Minas Gerais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 1, p. 157–166, 2012.

FONTES JARDIM, I. C. S.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2006. cap. 9, p. 273–398.

FREIRE, E. F. et al. Diazepam e nordiazepam em plasma: método de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 773–776, 2005.

FUSTINONI, S. et al. Comparison between blood and urinary toluene as biomarkers of exposure to toluene. **International archives of occupational and environmental health**, v. 73, n. 6, p. 389–396, 2000.

FUSTINONI, S. et al. Determination of urinary ortho- and meta-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 817, n. 2, p. 309–317, 2005.

GONZALEZ, K. C. et al. Estudo retrospectivo dos níveis de ácido hipúrico urinário em exames de toxicologia ocupacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1637–1641, 2010.

GREENWOOD, M. A. A brief review of inhalation toxicology and the development of a research proposal to demonstrate the relevance of an established mouse bioassay to biodefense objectives. Dissertação de Mestrado, 98f., 2006. Disponível em: <http://d-scholarship.pitt.edu/8123/1/Greenwood_PDF_7-5-2006.pdf>. Acesso em: 20 out. 2015.

HASLER, J. A. et al. Human cytochromes P450. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 20, n. 1-2, p. 1–137, 1999.

INOUE, O. et al. Limited validity of o-cresol and benzylmercapturic acid in urine as biomarkers of occupational exposure to toluene at low levels. **Industrial health**, v. 46, p. 318–325, 2008.

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.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). **Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles**. Environmental Health Criteria. Vol. 155. World Health Organization, Geneva, 1993.

JAKUBOWSKI, M.; TRZCINKA-OCHOCKA, M. Biological monitoring of exposure: Trends and key developments. **Journal of Occupational Health**, v. 47, n. 1, p. 22–48, 2005.

KLOTZ, U.; ANTONIN, K. H.; BIECK, P. R. Comparison of the Pharmacokinetics of Diazepam after Single and Subchronic Doses. **Europ. J. Clin. Pharmacol.**, v. 126, p. 121–126, 1976.

LÖF, A.; WALLÉN, M.; HJELM, E. W. Influence of Paracetamol and Acetylsalicylic Acid on the Toxicokinetics of Toluene. **Pharmacology & Toxicology**, v. 66, p. 138–141, 1990.

MARINGKA, M. et al. Biotransformation of diazepam in a clinically relevant flat membrane bioreactor model using primary porcine hepatocytes. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 343–353, 2011.

MARTINDALE. Diazepam. In: SWEETMAN, S. C. **The Complete drug reference**. 36. ed. Londres, 2009. p. 986–994.

MATEUS, F. H. et al. Reduction of enantioselectivity in the kinetic disposition and metabolism of verapamil in rats exposed to toluene. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 86, n. 5, p. 232–239, 2008.

MCCARVER, D. G. et al. A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 276–81, 1998.

MENDOZA-CANTÚ, A. et al. Occupational toluene exposure induces cytochrome P450 2E1 mRNA expression in peripheral lymphocytes. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 4, p. 494–499, 2006.

MIZUNO, D. et al. Chlorzoxazone: a probe drug whose metabolism can be used to monitor toluene exposure in rats. **Archives of toxicology**, v. 74, n. 3, p. 139–144, 2000.

MONTEIRO, D. A.; CARLOS, I. Z.; PINTO, F. G. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrofágica e a atividade de TNF- α ; na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 613–620, 2008.

NAKAJIMA, T. et al. Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 271–277, 1997.

NARAYANAN, S.; APPLETON, H. Creatinine : A Review. **Clinical chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1119–1126, 1980.

NARCISO, S. P. et al. Adaptation to stress induced by restraining rats and mice in nose-only inhalation holders. **Inhalation toxicology**, v. 15, p. 1133–1143, 2003.

NETTO, D. C. et al. Headspace solid-phase microextraction procedure for gas-chromatography analysis of toluene in urine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 1201–1206, 2008.

NEVES, S. M. P.; FILHO, J. M.; MENEZES, E. W. Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ / USP. São Paulo: **FCF-IQ/USP**, 2013.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8–35, 2009.

PETER, R. et al. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. **Chemical research in toxicology**, v. 3, n. 6, p. 566–73, 1990.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, C. S. et al. Chronic use of diazepam in primary healthcare centers: User profile and usage pattern. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 125, n. 5, p. 270–274, 2007.

RÍOS B., J. C.; SOLARI G., S. Biomonitorización de plaguicidas : ¿ Una necesidad del país ?

Rev Med Chile, v. 138, p. 515–518, 2010.

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/pt-br.php>>. Acesso em: 20 out. 2015.

SILVA, Z. L. et al. Determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil-hipúrico urinários por métodos cromatográficos : comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa capilar. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 197 - 204, 2002.

SKOOG, D. A. et al. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Belmont: Thomson, 2006. cap. 32, p. 897–923.

SKOOG, D. A. et al. Cromatografia Gasosa. In: **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Belmont: Thomson, 2006. cap. 31, p. 897–923.

SMITH, R. M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 3–27, 2003.

ST-PIERRE, M. V; PANG, K. S. Kinetics of sequential metabolism. II. Formation and metabolism of nordiazepam and oxazepam from diazepam in the perfused murine liver. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 265, n. 3, p. 1437–1445, 1993.

TRUCHON, G.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. o-cresol: a good indicator of exposure to low levels of toluene. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, v. 14, n. 10, p. 677–681, 1999.

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

WALKER, M. C. et al. Comparison of single- and repeated-dose pharmacokinetics of diazepam. **Epilepsia**, v. 39, n. 3, p. 283–289, 1998.

WANG, R.-S.; NAKAJIMA, T. Kinetic studies on toluene metabolism in ethanol- and phenobarbital-induced rat liver microsomes in vitro. **Archives of Toxicology**, v. 65, p. 39–44, 1991.

WETMORE, B. A. et al. Genotoxicity of intermittent co-exposure to benzene and toluene in male CD-1 mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, n. 3, p. 166–178, 2008.

WHITE, R. F.; PROCTOR, S. P. Solvents and neurotoxicity. **Lancet**, v. 349, n. 9060, p. 1239–1243, 1997.

WIN-SHWE, T. T.; FUJIMAKI, H. Neurotoxicity of toluene. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 93–99, 2010.

YANG, T. J. et al. Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 889–896, 1998.

ANEXO**ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 06/2015

Interessado: ALBERTO THALISON SILVEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isarita Martins Sakakibara

Projeto: Influência do Diazepam nos níveis dos bioindicadores de exposição ocupacional ao tolueno

Parecer nº 27/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de abril de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Influência do Diazepam nos níveis dos bioindicadores de exposição ocupacional ao tolueno”, apresentado pelo ALBERTO THALISON SILVEIRA, sob orientação da Professora Doutora Isarita Martins Sakakibara, da Universidade Federal de Alfenas - MG, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em SETEMBRO de 2015 em formulário para este fim.

Araraquara, 22 de abril de 2015.



Prof^a Dr^a CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

APÊNDICE

APÊNDICE A - PROTOCOLO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA


Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
PROTOCOLO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Título do Projeto: INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO TOLUENO

Título do Experimento: Exposição ao fármaco e aos solventes a fim de verificar a interação entre as substâncias

Previsão de Início do Experimento: agosto/2015

Término do Projeto:
setembro/2015

1 - Equipe envolvida no projeto/experimento

Responsável: Alberto Thalison Silveira

Integrante de Programa de Pós-Graduação: sim não

Programa: Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UNIFAL-MG

Iniciação Científica Mestrado Doutorado Pós-Doutorado Não se Aplica

Telefone: (35) 9922-9402	Ramal:	E-mail: albertothalison@hotmail.com
Orientador: Prof. Dra. Isarita Martins Sakakibara		
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais		
Departamento: Laboratório de Análise de Toxicantes de Fármacos		
Telefone: (35) 3299-1268 ou (35) 98025693	Ramal:	E-mail: isaritams@gmail.com
Colaboradores:		
Nome: Jose Salvador Lepera		
Instituição/Departamento: FCFAR-UNESP- Princípios Ativos Naturais e Toxicologia		
() Iniciação Científica () Mestrado () Doutorado (X) Pós-Doutorado () Outro:		
Telefone: 3301 6987	Ramal:	E-mail: salvadorlepera@gmail.com
Agência Financiadora: () Não (x) Sim. Qual? FAPEMIG		
Objetivos da Pesquisa: Avaliar a influência do diazepam na eliminação do tolueno, por meio da determinação do tolueno no sangue e orto-cresol na urina, em ratos expostos concomitantemente às duas substâncias.		

2 - Qualificação do(s) executor(es):

O(s) executor(es) tem domínio técnico dos procedimentos que serão desenvolvidos com os animais no estudo a ser realizado? Se

() Sim – Especifique: _____

(x) Não – Especifique a forma e duração do treinamento: O executor será treinado nos procedimentos de coleta dos fluidos biológicos dos animais (sangue e urina), bem como de ajustes e controles da câmara de exposição. O treinamento terá duração de três semanas (cerca de 120h) e ocorrerá no Biotério da Disciplina de Toxicologia da FCFAR-UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. José Salvador Lepera.

6.1.1 3 - Informações sobre o Modelo Animal
3.1 - Espécie utilizada: <input type="checkbox"/> Camundongo <input type="checkbox"/> Hamster <input type="checkbox"/> Gerbilo <input checked="" type="checkbox"/> Rato <input type="checkbox"/> Coelho <input type="checkbox"/> Cobaia <input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> Outro:
3.2 - Linhagem: Wistar
3.3 - Biotério de Procedência: Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
3.4 - Sexo: <input checked="" type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea
3.5 - Idade: 6 (semanas, aproximadas)
3.6 - Peso médio: 250 g ± 10 g

6.1.1.1 4 - Número de animais										
4.1 - Qual o critério utilizado para estabelecer o tamanho da amostra? (anexar referência) SAITO, T.; KUSAKABE, T.; TAKEICHI, S. Hippuric acid and methyl hippuric acid in rat hair: possible monitoring of xylene and toluene exposure. Forensic Science International , v. 133, p. 146–151, 2003.										
4.2 - Quantidade de animais por grupo experimental: 5										
4.3 - Número de grupos: 4										
4.4 - Especificar cada grupo:										
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Grupo (n= 5)</th> <th>Característica do grupo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Controle: não exposto ao diazepam e ao tolueno</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Exposto ao tolueno</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Exposto ao tolueno e ao diazepam</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Exposto ao diazepam</td> </tr> </tbody> </table>	Grupo (n= 5)	Característica do grupo	1	Controle: não exposto ao diazepam e ao tolueno	2	Exposto ao tolueno	3	Exposto ao tolueno e ao diazepam	4	Exposto ao diazepam
Grupo (n= 5)	Característica do grupo									
1	Controle: não exposto ao diazepam e ao tolueno									
2	Exposto ao tolueno									
3	Exposto ao tolueno e ao diazepam									
4	Exposto ao diazepam									
4.5 - Quantidade total de animais: 20										

6.1.1.2 5 - Condições de manutenção
5.1 - Biotério onde será mantido o animal: Biotério da Disciplina de Toxicologia da FCFAr-UNESP
5.2 - Padrão sanitário do biotério:
(x) Convencional () SPF () Germe Free () Outro:
5.3 - Ambiente de alojamento: () gaiola () baia () jaula () caixa plástica () Aquário (x) Outro: gaiola metabólica marca Nalgene, modelo 650 0100 para ratos de até 300 gramas Dimensões:
5.4 - Tipo de cama: (X) maravalha () estrado () outra:
5.5 - Água: Filtrada (x) sim () não Autoclavada () sim () não Outra:
5.6 - Alimentação: Ração Industrial (x) sim () não Qual: Fornecida pelo Biotério da FCFAr-UNESP Suplemento () sim () não Qual: Dieta Específica: não
5.7 - Frequência de limpeza e manutenção: A limpeza será realizada três vezes por semana, podendo ser diária se ocorrer diarreia em algum animal exposto. Esclarecemos que a limpeza é feita durante o período de exposição e, portanto, não gera estresse adicional aos animais.
5.8 - Há climatização e exaustão do ar: (x) sim () não

6.1.1.3 6 - Procedimentos Experimentais			
6.1.1.4 6.1 - Laboratório onde serão realizados os experimentos: Biotério da Disciplina de Toxicologia da FCFAr-UNESP			
6.2 - Jejum	<input type="checkbox"/> sim	<input checked="" type="checkbox"/> não	duração:
6.3 - Restrição hídrica	<input type="checkbox"/> sim	<input checked="" type="checkbox"/> não	duração: horas
6.4 – Anestesia/Sedação <input checked="" type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Nome genérico: Quetamina/Xilazina			
Dose (expressar a concentração em mg/kg): 75 mg kg ⁻¹ Quetamina + 10 mg kg ⁻¹ Xilazina			
Via: Intraperitoneal			
6.5 - Analgesia <input type="checkbox"/> sim <input checked="" type="checkbox"/> não			
Nome genérico:			
Dose (expressar a concentração em mg/kg):			
Via:			

6.6 – Procedimento Cirúrgico: () sim (x) não

Descreva o procedimento:

- Anestesia/Sedação

Nome genérico:

Dose (expressar a concentração em mg/kg):

Via:

- Recuperação pós-cirúrgica:

() sim - Período:

() não - Justificar:

- Analgesia Pós-operatória

() sim

Nome genérico:

Dose (expressar a concentração em mg/kg):

Via:

() não Justificar:

- Antibiótico/Quimioterápico

() sim

Nome genérico:

Dose (expressar a concentração em mg/kg):

Via:

() não Justificar:

6.7 - O modelo experimental causa:

Dor: () sim (x) não Estresse: (x) sim () não Anorexia: () sim (x) não

Observação: Em caso afirmativo (especificidade), para qualquer um dos dois itens acima envie cópia de 2 (dois) trabalhos referentes a mesma metodologia empregada, preferencialmente de autores não envolvidos no projeto e justifique:

O estresse é provocado pela contenção do animal para seu posicionamento adequado na câmara de exposição e, em nossa experiência, não tem sido observados fenômenos críticos como hipertermia, agitação ou agressividade dos animais. Em estudo dirigido à questão, com ratos e camundongos, observou-se início da remissão do estresse a partir do 4° dia de exposição e completa adaptação a partir do 14° dia (cf. Narciso, SP et al. Adaptation to stress induced by restraining rats and mice in nose-only inhalation holders. *Inhal Tox*, 15:1133–1143, 2003, anexo 1). Em particular, a depleção de glutathiona hepática que poderia ser relevante para o experimento, deixa de ser significativa a partir do 5° dia de exposição (cf. Fechter, LD et al. Depletion of Liver Glutathione Levels in Rats: A Potential Confound of Nose-Only Inhalation. *Inhal Tox*, 20: 885–890, 2008, anexo 2).

6.8 - Exposição e/ou inoculação de agentes químicos/ físicos/biológicos/mecânicos:

() sim () não Qual(is): Tolueno e diazepam

Via e doses:

1 - Tolueno: via inalatória, por sistema Nose Only Exposure System, na concentração de 74,5 mg/m³, por 6 h diárias, 5 dias por semana durante 6 semanas.

2 - Diazepam, 10 mg kg⁻¹, por gavagem, dose única diária, 5 dias por semana, durante 6 semanas.

Duração: seis semanas.

O estudo tem o objetivo de mimetizar a exposição a solventes orgânicos, no ambiente laboral, de indivíduos que fazem uso concomitante de diazepam, sendo assim, a semana de trabalho é representada pelos “5 dias por semana”. Para a simulação da jornada de trabalho diária, usualmente oito horas, será adotado períodos de seis horas, pois este é o regime máximo de exposição sem exacerbação do estresse aos animais. O ciclo total de exposições (6 semanas), foi baseado no trabalho executado por Cardoso (2012), ver referências, e pretende assegurar ao menos um *turnover* completo da(s) enzima(s) de interesse, cuja extensão exata não é de nosso conhecimento, além de tentar simular um período de exposição múltipla, que é a situação real, no ambiente ocupacional.

6.9 - Extração de fluídos *in vivo*: () sim () não Qual(is): Sangue e urina

Volume: 5 mL de sangue e 2 mL de urina

Descrição sumária do procedimento: a coleta de sangue será feita por punção cardíaca, após confirmação da anestesia, seguindo-se o sacrifício imediato em câmara de CO₂.

A urina será coletada durante a última noite da última semana do protocolo, alojando-se o animal em gaiola metabólica e recolhendo a micção espontânea.

6.10 - Extração de órgãos/vísceras/tecidos/fluídos: () sim () não Qual(is):

Antes ou após a eutanásia:

Descrição sumária do procedimento:

6.11 - Estão previstos efeitos adversos? Especifique e descreva medidas planejadas para amenizar estes efeitos: Não são previstos efeitos adversos. A dose de diazepam é a usual para seus efeitos terapêuticos em humanos, assim como os níveis de exposição ao tolueno são compatíveis com o limite para a exposição humana de duração similar.

7 - Destino dos Animais
7.1 - Reaproveitado: () sim (x) não Como:
7.2 – Eutanásia: () deslocamento cervical () decapitação () perfusão sob anestesia () aprofundamento da anestesia (x) CO ₂ () exsanguinação sob anestesia Consultar a Resolução Normativa 13/2013 CONCEA - Diretrizes da Prática de Eutanásia
7.3 - Justificar a escolha (baseada em literatura anexa): A eutanásia de pequenos roedores utilizando CO ₂ é prática considerada aceitável em experimentação animal (cf NIH Guidelines for Euthanasia of Rodents Using Carbon Dioxide, revisão 5/08/2013, disponível em oacu.od.nih.gov/.../Rodent_Euthanasia_Adult.pdf , acesso em 7/1/2015, cópia - anexo 3)

8 - Resumo do procedimento experimental incluindo justificativa da finalidade do uso de animais:

Os animais serão expostos ao tolueno em uma câmara do tipo NOES (Nose Only Exposure System), situada no biotério da disciplina de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP.

Os estudos serão realizados com 4 grupos de ratos machos, Wistar, de 250 ± 10 g, provenientes do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Antes dos experimentos os animais permanecerão 3 dias no biotério para adaptação (sob ciclo luz-escuro de 12 horas), com temperatura da sala de 20 ± 1 °C, umidade de $60 \pm 20\%$ e livre acesso à ração e água. Os grupos experimentais e respectivos procedimentos são:

- **Grupo 1 n=5 (Controle):** os animais serão imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, expostos apenas ao ar. Ao final dos ciclos de exposição, os ratos permanecerão durante a noite (16 h) em gaiolas metabólicas de policarbonato para coleta da urina. Na manhã seguinte, após anestesia, serão coletadas as amostras de sangue por punção cardíaca, seguindo-se sacrifício imediato em câmara de CO₂. As amostras serão armazenadas a -80°C até o momento das análises.

- **Grupo 2 n=5 (Tolueno):** os animais serão tratados com vapor de tolueno 99,99% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por inalação, na concentração de 75,4 mg/m³ (TLV-TWA), 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle. Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como o sacrifício dos animais, serão conforme o descrito para o grupo controle.

- **Grupo 3 n=5 (Tolueno/Diazepam):** os animais serão tratados com vapor de tolueno 99,99% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por inalação, na concentração de 75,4 mg/m³ (TLV-TWA), 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, seguindo-se o mesmo protocolo experimental descrito para o grupo controle. Antes de cada exposição os animais receberão, por via oral (gavagem), diazepam (Valium® injetável) diluído em água, na dose de 10 mg kg⁻¹. Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como o sacrifício dos animais, serão conforme o descrito para o grupo controle.

- **Grupo 4 n=5 (Diazepam):** os animais serão imobilizados pelos contentores da câmara de exposição durante 6 horas/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas, expostos apenas ao ar. No início de cada dia de experimento os animais receberão, por via oral (gavagem), diazepam (Valium® injetável) diluído em água, na dose de 10 mg kg⁻¹. Os procedimentos de coleta de amostras e armazenamento, assim como o sacrifício dos animais, serão conforme o descrito para o grupo controle.

Justificativa: Os ensaios em animais permitem o controle experimental de variáveis, em um nível que não poderia ser atingido em um estudo com humanos, simultaneamente expostos, possibilitando assim a detecção de variações sutis decorrentes da interação fármaco/solvente e diminuindo, de forma drástica, o tempo necessário para obtenção da informação científica, extremamente relevante, em relação à exposição ocupacional e à ingestão de fármacos. Esse tipo de ensaio confirma a hipótese do estudo, sem a necessidade de um enorme investimento financeiro e de tempo, os quais necessários à investigação em humanos.

Referências Bibliográficas

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). TLVs® and BEIs®: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices. Cincinnati, 2010.:

CARDOSO, J. L. C. Influência da exposição inalatória a combustíveis automotivos na atividade do CYP3A, CYP2C e CYP2D em ratos tratados com fármacos quirais. Biblioteca Virtual de Teses e Dissertações, Ribeirão Preto, 91f., 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-10012013-155615/pt-br.php>>. Acesso em: 20 out. 2014.

NEVES, SILVÂNIA M. P. *et al.* Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP. FCF-IQ/USP. São Paulo, 2013.

Termo de Responsabilidade

Nós, Alberto Thalison Silveira e Isarita Martins Sakakibara responsáveis pelo experimento intitulado “**INFLUÊNCIA DO DIAZEPAM NOS NÍVEIS DOS BIOINDICADORES DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO TOLUENO**”, asseguramos à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP do Câmpus de Araraquara que:

1. Lemos os Princípios Éticos na Experimentação Animal de acordo com a Resolução Normativa nº 12/2013 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA e concordamos plenamente com as suas exigências durante a vigência deste protocolo;
2. Conhecemos e cumpriremos as normas de criação e uso ético de animais, previstas na Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 e no Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009;
3. O projeto apresentado para análise está devidamente instruído de acordo com os Princípios Éticos no manejo Animal, previstos na Lei nº. 11.794 de 08 de outubro de 2008 e no Decreto nº. 6.899 de 15 de julho de 2009;
4. Este estudo não é duplicativo e a equipe técnica e de apoio envolvida nas atividades com animais neste projeto foi treinada, é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo e está ciente da responsabilidade no trato dos mesmos;
5. Solicitaremos a autorização prévia à CEUA para efetuar qualquer mudança no protocolo anteriormente aprovado, assim como notificaremos qualquer mudança na equipe técnica;
6. As atividades serão iniciadas somente após decisão técnica favorável da CEUA e, quando for o caso, da autorização do CONCEA;
7. Comunicaremos à CEUA, imediatamente, todos os acidentes com animais, relatando as ações saneadoras porventura adotadas;
8. Estabeleceremos junto à diretoria da FCF/CAR mecanismos para a disponibilidade e a manutenção dos equipamentos e da infraestrutura de criação e utilização dos animais utilizados nesta pesquisa;
9. Forneceremos à CEUA informações adicionais, quando solicitadas, e atenderemos a eventuais auditorias realizadas;
10. Confirmamos a inexistência de métodos substitutivos que possam ser utilizados como alternativa à utilização de animais na pesquisa proposta.
11. Tudo o que foi declarado nesse protocolo é a absoluta expressão da verdade. Estamos cientes que o não cumprimento das condições aqui especificadas é de nossa total responsabilidade e que estaremos sujeitos(as) às punições previstas na legislação em vigor.

Araraquara, 19 de janeiro de 2015.

Alberto Thalison Silveira

Isarita Martins Sakakibara