UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

 **ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DA DIPIRONA ISOLADA E ASSOCIADA AO TRAMADOL EM ASININOS**

**Luã Barbalho de Macêdo**

MOSSORÓ-RN

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO

PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DA DIPIRONA ISOLADA E ASSOCIADA AO TRAMADOL EM ASININOS**

**Luã Barbalho de Macêdo**

Exame de Qualificação de doutorado acadêmico apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Profª. Dra. Valéria Veras de Paula

MOSSORÓ-RN

2019

LISTA DE SIGLAS

AA – 4-aminoantipirina

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

AUC0-∞ - Área da curva extrapolada ao infinito

AUC0-t – Área da curva no tempo 0 até o último tempo detectável

CL/F – Depuração aparente

Cmax – Concentração plasmática máxima

DIP – Dipirona

EDTA – Etileno Diamino Tetra-Acético

EUA – Estados Unidos da América

LC-MS/MS – Cromatografia líquida com Espectrômetro de Massas

M1 – O-desmetiltramadol

M2 – N-desmetiltramadol

M3 – N,N-Didesmetiltramadol

M4 – N,N,O-Tridesmetiltramadol

M5 – N,O-Didesmetiltramadol

MAA – 4-Metilamina Antipirina

MAO – Monoamino oxidase

Min – Minutos

MRM – Monitoramento de Reações múltiplas

MRT - Tempo médio residual do momento

MS – Espectometro de massa

MT – Metamizol

T1 – Tratamento do grupo um

T1/2 – Meia Vida de eliminação

Tmax – Tempo para atingir a concentração máxima

TR – Tramadol

UPLC – Cromatografia líquida de ultra pressão

V/F – Volume de distribuição aparente

**SUMÁRIO**

[RESUMO 6](#_Toc12724359)

[INTRODUÇÃO 7](#_Toc12724360)

[REVISÃO DE LITERATURA 9](#_Toc12724361)

[I. Analgesia em equídeos 9](#_Toc12724362)

[II. Dipirona 10](#_Toc12724363)

[III. Tramadol 11](#_Toc12724364)

[IV. Interação entre esses fármacos 13](#_Toc12724365)

[OBJETIVOS 14](#_Toc12724366)

[I. Objetivo Geral 14](#_Toc12724367)

[II. Objetivos Específicos 14](#_Toc12724368)

[METODOLOGIA A SER EMPREGADA 15](#_Toc12724369)

[I. Animais e desenho experimental 15](#_Toc12724370)

[II. Determinação das concentrações dos fármacos e metabolitos em plasma 15](#_Toc12724371)

[III. Condições analíticas (LC-MS/MS) 16](#_Toc12724372)

[IV. Validação 17](#_Toc12724373)

[V. Análise farmacocinética 17](#_Toc12724374)

[VI. Análise estatística 18](#_Toc12724375)

[RESULTADOS ESPERADOS 19](#_Toc12724376)

[CRONOGRAMA 20](#_Toc12724377)

[REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 21](#_Toc12724378)

[ANEXO 1 26](#_Toc12724379)

#

# RESUMO

Os asininos são animais rústicos, porém susceptíveis a situações as quais possam lhe causar agravos a saúde, principalmente processos dolorosos dos quais há poucas terapias farmacológicas disponibilizadas para a espécie. Em virtude disso, o presente trabalho visa avaliar a farmacocinética da dipirona isolada, assim como sua associação com tramadol e administrados em dose única por via intravenosa em asininos. Para tanto, serão utilizados 10 jumentos (*Equus asinus*) previamente aclimatados e avaliados quanto a higidez por meio de exame clínico e análise hematológica, parasitológica e bioquímica completa. Todos os animais integrarão os grupos de estudo, sendo realizado um descanso entre tratamentos de 15 dias. Os animais receberão os seguintes tratamentos: No tratamento 1 (T1) dipirona, na dose de 10 mg.kg-1, T2 – dipirona 25mg.kg-1 e T3 - 2mg.kg-1 de tramadol e 10 mg.kg-1 de dipirona e no T4, 2mg.kg-1 de tramadol e 25 mg.kg-1 de dipirona. Todos os tratamentos serão feitos por via intravenosa lenta. Após tempos pré-determinados, serão coletadas amostras de sangue desses animais para posterior análise farmacocinética. Alíquotas de plasmas serão processadas e injetadas no sistema cromatográfico. A análise cromatográfica será realizada no sistema UPLC-MS/MS. Os parâmetros avaliados serão: a concentração plasmática máxima (Cmax), o tempo para atingir a Cmax (Tmax), a área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero até ao momento da última concentração mensurável (AUC0→t) e a extrapolação da AUC até ao infinito (AUC0→ ∞), volume de distribuição aparente (Vz/F), depuração aparente (CL/F), meia-vida de eliminação (T1/2); Tempo médio residual até o momento da última mensuração (MRT0→ t ), Tempo médio residual do momento zero até o infinito(MRT0→ ∞), para os fármacos e seus metabólitos serão calculados usando modelos não compartimentais com o software WinNonlin 6.2.1. Por fim, esperamos com esse projeto e seus resultados sermos capazes de avaliar a farmacocinética da dipirona e de seus metabólitos isolados ou em associação com o tramadol em asininos e de posse desses parâmetros farmacológicos estabelecer a dosagem que melhor atenda a demanda desta espécie em processos álgicos.

Palavras-Chave: Desmetil-tramadol; Metamizol, Cromatografia, metoprolol.

# INTRODUÇÃO

Os asininos são animais que trabalham, principalmente nos países em desenvolvimento, para transportar mercadorias e pessoas, muitas vezes em calor e umidade extremos, em ambientes de trabalho urbano, onde há riscos de acidentes devido ao tráfego pesado, ruídos e poluição (Regan et al., 2014; Dai et al., 2016). Esses fatores predispõem os animais a traumas e outras patologias que podem estar associados a processos dolorosos e estresse. A dor em equídeos pode ser bastante debilitante sendo a principal responsável por eutanásia consequências de patologias como por exemplo a laminite ou a síndrome cólica (Matthews; Carroll, 2007).

A Dipirona (DIP), também conhecida como metamizol (MT), é de particular interesse para os veterinários de equinos, pois é indicada no tratamento de cólicas, dores musculares, febres e após intervenções cirúrgicas no Brasil por se tratar de um bom analgésico e um excelente antipirético (Cook et al., 2015; Giorgi et al. 2017; Zaro et al., 2018). Porém, foi retirada do mercado nos EUA, Japão, Irã e no Reino Unido por apresentar um raro efeito colateral em seres humanos, a agranulocitose (Hedenmalm; Spigset, 2002).

O Tramadol (TR) é um analgésico opioide muito prescrito por veterinários (Abbiati et al., 2017). É usado rotineiramente no tratamento de dores musculoesqueléticas, pós-operatórias e crônicas em animais (Udegbunam et al., 2015; Bortolami et al., 2015). Estudos farmacológicos do tramadol e de seus principais metabólitos indicaram diferenças interespécies no metabolismo das drogas, apoiando o fato de que os estudos farmacocinéticos são necessários para determinar os regimes de dosagem para cada uma delas (Cagnardi et al., 2011; Sheikholeslami et al., 2016. Evenson; Mans,2019).

A administração combinada de opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) pode produzir efeitos aditivos ou supraditivos ao mesmo tempo em que reduz efeitos indesejados (Moreno-Rocha et al., 2016). Em estudos prévios, foram testadas 25 combinações de diferentes doses de dipirona associada ao tramadol ambos em aplicação única e em todas elas observou-se efeito antinoceptivos aditivos ou potencializados em camundongos quando comparado com o tratamento usando as drogas isoladamente (López-Muñoz et al., 2013).

A farmacologia de diversas drogas é pouco compreendida em asininos devido à falta de estudos farmacocinéticos nesta espécie e muitas vezes os medicamentos, doses e intervalos de administração usados são baseados em tratamentos prescritos para equinos. Além disso, os asininos diferem dos equinos em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (Matthew; Van Loon, 2013). Sendo, o conhecimento das propriedades farmacocinéticas dos medicamentos é fundamental para garantir uma administração terapêutica eficaz e segura (Abbiati et al., 2017)

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o perfil farmacocinético da dipirona e de seus metabólitos quando a mesma é administrada isoladamente na dose de 10 e 25 mg.kg-1. Assim como a farmacocinética da dipirona e de seus metabólitos quando administrada em associação com o tramadol na dose de 2mg.kg-1 sendo todos administrados em dose única e por via intravenosa em asininos.

# REVISÃO DE LITERATURA

## Analgesia em equídeos

O reconhecimento da dor e terapia analgésica apropriada vem tornando-se cada vez mais importante na medicina veterinária (Cox et al, 2010). O tratamento da dor é importante para o bem-estar e higidez de equídeos. Atualmente a medicina veterinária dispõe de poucos medicamentes licenciados para o controle da dor para essa espécie (Tavanaeimanesh et al., 2018).

 As terapêuticas são frequentemente administradas a asininos com base na dosagem e nos intervalos recomendados para equinos, porque poucos fármacos têm indicações de rótulos específicos de asininos (Grosenbaugh et al., 2011). No entanto, diferenças entre essas duas espécies, na distribuição de drogas, metabolismo e eliminação, foram observadas para a maioria dos agentes terapêuticos estudados.

*Particularidades fisiólogicas*

 O asinino é uma espécie que apresenta fisiologia intrigante, com muitas diferenças importantes que devem ser observadas e apreciadas quando se trabalha, gerencia ou trata esses animais e atualmente não é mais aceitável simplesmente olhar o jumento e tratá-lo como um “cavalo pequeno com orelhas grandes” (Grosenbaugh et al., 2011; Burden; Thiemann, 2015).

 Fisiologicamente, o asinino apresenta diferenças na temperatura corpórea, pulso e frequência cardíaca e respiratória (Burden; Thiemann, 2015). Além disso, apresenta parâmetros hematológicos diferentes aos dos equinos (Mendoza et al., 2013; Alberghina et al., 2013). Os principais são: a concentração de proteínas plasmáticas, as quais são responsáveis pelo carreamento de muitos fármacos por todo o organismo do animal e os hormônios tireoidianos, que são maiores em jumentos em comparação a equinos, e esses são responsáveis pelo aumento da atividade metabólica e assim acelerando a metabolização e a excreção de fármacos.

 Por serem oriundos de climas secos, como desertos e semiáridos, os asininos são capazes de controlar de maneira mais satisfatório os fluidos corpóreos. Por exemplo, é capaz de manter o volume plasmático mesmo em casos de desidratação (com perdas de 20% da quantidade de água normal do corpo) enquanto que os equinos são mais acometidos (Matthews; Carroll, 2007).

## Dipirona

A dipirona é um fármaco derivado da pirazolona que embora seja classificada como um ácido enólico, é descrita separadamente devido a sua fraca ação anti-inflamatória. (Rodríguez-Silverio et al., 2009; Domínguez-Ramírez et al., 2010). É uma droga não opioide, usada em humanos e na medicina veterinária, que possui uma alta eficiência, no tratamento de febre e de dores leves a moderadas, como também na dor visceral (Zanuzzo et al., 2015; Aupanun et al., 2016).É considerado como um inibidor fraco de COX-1 e COX-2, mas um forte inibidor de COX-3, além de atuar causando a supressão da síntese de prostaglandinas (Flôr et al., 2013; Kim et al., 2018).

O metamizol é um fármaco liberado para uso em equinos, bovinos, suínos, felinos e cães por via oral ou parenteral com doses variando de 20 a 50mg.kg-1 (Aupanun et al., 2016; Giorgi et al., 2017).

A baixa toxicidade e eficácia dão suporte ao vasto uso clínico deste fármaco. Entretanto, ela foi proibida em alguns países devido ao seu potencial em causar discrasias sanguíneas, principalmente em humanos, no entanto, o risco de provocar agranulocitose depende da dose, duração de utilização e associação com outros fármacos (Ibáñez et al., 2005; Aupanun et al., 2016).

*Farmacocinética*

Devido à restrição em muitos países, a farmacocinética da dipirona é pouco estudada (Aupanun et al., 2016). O metamizol é rapidamente hidrolisado em quatro metabolitos. Os efeitos farmacológicos são atribuídos ao metabolito primário ativo 4-metilaminoantipirina (MAA) e ao seu subproduto, 4–aminoantipirina (AA). O MAA é formado em quantidades muito maiores em comparação com outros metabólitos menores. (Kim et al., 2018).

Aupaun et al., (2016) estudando a farmacocinética de dipirona em asininos foram capazes de detectar concentrações plasmáticas de MAA a partir de 5 minutos e em até 10 horas depois da administração de metamizol por via intravenosa ou intramuscular em dose única, já o AA foi detectado entre 5 minutos e 8 horas em ambas vias de administração.

Em humanos, o efeito analgésico da dipirona está relacionado com a concentração de seus metabólitos, os quais diferem em relação ao seu tempo de surgimento (MAA> AA) e meia-vida (MAA: 4–5 horas e AA: 5-8 horas) (Nikolova et al., 2012). A 4-metil-amino-antipirina é cerca de 50 vezes mais eficiente que a MT como inibidor das cicloxigenases, enquanto a AA é menos ativa que a MT. Portanto, ambos os metabólitos podem contribuir para as características clinicamente relevantes de início rápido e longa duração do efeito, permitindo intervalos de dosagem com intervalos de 8 a 10 horas.

 *Efeitos adversos*

Embora MT pareça ser uma droga relativamente segura (Imagawa et al., 2011) em comparação com outros analgésicos, há algumas evidências, que não são unanimemente aceitas, sugerindo que, após administração prolongada, a MT pode causar alguns danos ao sistema hematopoiético, desencadeando leucopenia, agranulocitose e até mesmo anemia aplásica em humanos (Basak et al., 2010; Giorgi et al., 2015).

## Tramadol

 O tramadol é uma droga analgésica sintética que demonstra propriedades opioides e não opioides, atuando principalmente no sistema nervoso central (Vazzana et al., 2015). Os efeitos antinociceptivos são devidos a um mecanismo de ação duplo (opioide e não opioide). Isso se deve ao fato do TR atua nos receptores µ-opióide e κ-opióide com baixa afinidade, exercendo assim um fraco efeito agonista. Além disso atua nos receptores de monoamina oxidase (MAO) bloqueando a recaptação de norepinefrina e serotonina, o que inibe a transmissão dolorosa pela medula espinal, sendo esta segunda a principal via analgésica (Souza; Cox, 2011; Read et al., 2019).

Este fármaco é estruturalmente semelhante a morfina e a codeína, porém é 6000 vezes menos potente que a morfina e 10 vezes menos que a codeína (Vazzana et al., 2015). Entretanto, o TR é mais vantajoso do que outros agentes opioides típicos, devido ao seu perfil farmacológico único, uma vez que exibe menor efeitos colaterais, como depressão cardiopulmonar, quando comparo a fármacos do mesmo grupo (Flôr et al., 2013).

A resposta analgésica do tramadol é intimamente correlacionada ao seu metabolismo, devido a diferentes atividades analgésicas de seus subprodutos. O-desmetiltramadol (M1) é relatado como sendo a principal substância ativa e é 300 vezes mais potente no receptor µ do que a molécula antes da metabolização (Giorgi et al., 2009)

Este fármaco oferece muitas vantagens como opção terapêutica; é um analgésico barato e pode ser administrado por via oral em animais de companhia (Cox et al., 2010). Embora seja licenciado, e ainda sim somente em alguns países, é apenas para uso em cães e gatos (Read et al., 2019). Contudo, seu uso, experimentalmente, já foi relatado em aves, repteis, anfíbios (Souza; Cox, 2011) e em mamíferos como: cavalos (Abbiati et al., 2017), chinchila (Evenson; Mans, 2019), ovinos (Bortolami et al., 2015), asininos (Marzok; El-khodery, 2015), bovinos (Baniadam et al., 2010) e dromedários (Azari et al., 2017).

 *Farmacocinética*

O Tramadol está disponível numa variedade de formulações farmacêuticas para ser administrados por subcutânea, intramuscular, intravenosa, sublingual e oral (Subedi et al., 2019). Ele é, em sua maioria, metabolizado no fígado através das isoenzimas do citocromo P450-2D6 e P450-3A4, para O-desmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2), respectivamente, sendo os principais produtos da fase 1. Estes são ainda metabolizados em três outras substâncias secundárias, nomeadamente N-,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4), e N-,O-didesmetiltramadol (M5) (Giorgi et al., 2017).

Todos os metabolitos são conjugados com ácido glucurônico e sulfato antes da excreção pela urina (Lavasani et al., 2013). A via de eliminação envolve quase totalmente os rins. Aproximadamente 30% da dose é excretada na urina como droga inalterada, enquanto 60% da dose é excretada como metabólitos. A droga restante é eliminada nas fezes, portanto a excreção biliar é quase insignificante (McMillan et al., 2008; Abbiati et al., 2017).

Tem sido relatado que este medicamento é metabolizado mais rapidamente em subprodutos inativos em cabras, cães e cavalos do que em gatos. A eficácia clínica do tramadol tem sido questionada em espécies que metabolizaram essa molécula principalmente em metabólitos inativos (Giorgi et al., 2009). A biodisponibilidade após administração oral de 2 mg.kg-1 (dose preconizada em pequenos animais) em equídeos é baixa. Em equinos, foi verificado disponibilidade de apenas 3% (Cox et al., 2010) e em asininos de 11% (Giorgi et al., 2009). Entretanto, quando aumentada a dose para 5 mg.kg-1, a biodisponibilidade, em equinos, aumentou para 64% (Giorgi et al., 2009)

 *Efeitos adversos*

Não foram relatados efeitos colaterais do tramadol aplicados na dose de 2mg.kg-1 por via oral em equinos. No entanto, foi relatado que agitação de curta duração, tremores, taquicardia e espasmos musculares ocorreram 15 minutos após a administração intravenosa rápida (Cox et al., 2010). Giorgi et al., (2009) não observam efeitos adversos após aplicação de 2,5 mg.kg-1 de tramadol por via intravenosa e via oral em asininos. A falta de efeitos colaterais pode ser atribuída tanto à baixa dose de droga administrada quanto ao tempo de infusão longo. A dose e a velocidade de infusão são bem conhecidas por produzir efeitos colaterais em humanos.

## Interação entre esses fármacos

Em um protocolo de analgesia multimodal, a combinação de diversos fármacos com mecanismos de ação diferentes pode produzir efeitos aditivos ou supraditivos ao mesmo tempo em que reduz efeitos indesejados (Jasiecka et al., 2014; Moreno-Rocha et al., 2016). O mecanismo farmacodinâmico para a interação entre o dipirona e o tramadol pode ser parcialmente atribuído à interação de mecanismos como a via do GMP cíclico da L-arginina-NO e a interação com os receptores do ácido N-metil D-aspártico (López-Munoz et al., 2013).

A associação de metamizol e tramadol vem sendo muito utilizado no tratamento de dores moderadas a intensas em animais acometidos por neoplasias, artrites ou submetidos a cirurgia de castração (Imagawa et al., 2011; Flôr et al., 2013; Teixeira et al., 2013; Moreno-Rocha et al., 2016). E os resultados vêm demonstrando que a associação possui efeito potencializador no tratamento de dores (Moreno-Rocha et al., 2012).

Em camundongos saudáveis e outros com artrite foram tratados com tramadol e dipirona, não se observou interação farmacocinética entre os medicamentos quando coadministrados em dose única. Enquanto, que a administração dos dois em doses repetidas, observou-se interação farmacocinética entre eles (Moreno-Rocha et al., 2012; Moreno-Rocha et al., 2016). Entretanto, em ambos os tratamentos houve potencialização analgésica em relação ao tratamento de qualquer uma das drogas isoladas.

# OBJETIVOS

## Objetivo Geral

Estabelecer o perfil farmacocinético da dipirona isolada e de seus metabólitos e de sua associação com tramadol em asininos.

## Objetivos Específicos

Validar metodologia analítica para determinação da dipirona e seus metabólitos, 4-Metilaminaantipirina (MAA) e o 4-aminoantipirina (AA), em plasma sanguineo asinino;

Validar metodologia analítica para a determinação da associação de dipirona e tramadol em plasma asinino.

Determinar os parâmetros farmacocinética da dipirona e seus metabolitos ativos na dose de 10 e 25 mg.kg-1

Determinar os parâmetros farmacinéticos da associação dipirona e tramadol nas doses 10 e 2 e 25 e 2 mg.kg-1, por via intravenosa

# METODOLOGIA A SER EMPREGADA

## Animais e desenho experimental

Serão utilizados 10 jumentos (*Equus asinus*) adultos. Os asininos serão previamente aclimatados e avaliados quanto a higidez por meio de exame clínico e análise hematológica, parasitológica e bioquímica completa. Os mesmos animais serão submetidos a todos os tratamentos com um intervalo entre os tratamentos de 15 dias.

Os animais serão submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas. Para permitir tanto a administração intravenosa dos fármacos quanto a coleta de sangue, um cateter de calibre 16G será fixado a veia jugular e a ele será acoplado uma torneira de 3 vias.

Feita a coleta de sangue controle, os asininos receberão os seguintes tratamentos: No tratamento 1 (T1) dipirona (D500®, Zoetis, SP- Brasil), na dose de 10 mg.kg-1, T2 – dipirona 25mg.kg-1 e T3 - 2mg.kg-1 de tramadol (Tramadon®, Cristália, SP - Brasil) e 10 mg.kg-1 de dipirona e no T4, 2mg.kg-1 de tramadol e 25 mg.kg-1 de dipirona. Todos os tratamentos serão feitos por via intravenosa lenta (2 minutos para total aplicação do medicamento). Após a aplicação dos fármacos, amostras de 10ml sangue serão coletadas em horários predefinidos conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Horário das coletas de sangue dos asininos após administração de Tramadol e Dipirona por via intravenosa.

|  |
| --- |
| TEMPO |
| 0:00’ | 0:05’ | 0:10’ | 0:20’ | 0:30’ | 0:40’ | 0:50’ | 1h | 1:15 h | 1:30h |
| 1:45h | 2:00h | 2:30h | 3:00h | 4:00h | 6:00h | 8:00h | 12:00h | 24:00h | 48:00h |

O sangue será acondicionado em tubos de vidro contento ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, serão centrifugadas por 5 minutos a 3.500rpm para retirada do plasma sanguíneo os quais serão realocados em criotubos de 2 ml e armazenados em freezer a -80ºC até o momento da análise.

## Determinação das concentrações dos fármacos e metabolitos em plasma

Alíquotas dessas amostras de plasma (250 uL) serão adicionadas de 10 uL de solução de metoprolol 0,1mg/mL (padrão interno) e 800 ul de acetonitrila, seguido de homogeinização em vórtex por 60s e em seguida centrifugadas por 5 min a 4200 rpm. O sobrenadante (900 ul) será transferido para vials e 5 uL são injetados no sistema cromatográfico.

## Condições analíticas (LC-MS/MS)

A análise cromatográfica será realizada no sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), constituído por Nexera 2 UPLC acoplado a um detector de espectrometria de massa LCMS-8040 (Shimadzu, Japan) e coluna Shimadzu UPLC BEH C18 (1,7 μm, 2,1 × 75 mm) (Shimadzu, Japan). A fase móvel será acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,1% (75:25, v/v) a 0,3 mL/min. O tempo de corrida é de 2,0 min; o volume de amostra injetado será de 5,0 μL. A temperatura da coluna será ajustada para 40 °C e o refrigerador do amostrador automático será regulado para 5 °C. Para Tramadol, ODT, 4-MAA e 4-AA, o espectrômetro de massa será ajustado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) no modo de ionização positivo ESI. A energia de colisão e a tensão do cone foram 12 e 19 V, respectivamente. A taxa de fluxo do gás cone e dessolvatação será ajustada para 150 e 600 L/min, respectivamente, usando argônio como gás de colisão na vazão de 0,15 mL/min. O espectrômetro de massa será ajustado para monitorar a transição da faixa do íon principal e íon filho segundo a tabela 2. Com tempo de permanência de 0,3 s. Dados de MRM serão adquiridos e analisados ​​através do software Labsolution (Shimadzu, Japan).

Tabela 2. Relação massa e carga (m/z) dos íons principais e íons filhos do tramadol, O-desmetiltramadol (ODT), 4-metilaminoantipirina (4-MAA), 4-aminoantipirina (4-AA) e metoprolol (Padrão interno).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Analito | Íon principal (m/z) | Íon Filho (m/z) |
| Tramadol  | 264,00 | 58,00 |
| O-desmetiltramadol | 250,00 | 58,00 |
| 4-metilaminoantipirina | 218,20 | 159,10 |
| 4-aminoantipirina | 204,20 | 76,90 |
| Metoprolol | 268,10 | 131,1 |

## Validação

O método analítico será validado de acordo com os critérios estabelecidos pelo ICH (2018). Plasma sem drogas serão enriquecidos com solução de padrões para obter uma curva de calibração. Da mesma forma, amostras de controle de qualidade (pontos) serão preparadas em baixas, médias e altas concentrações, e estas serão usadas para determinar a recuperação absoluta e precisão de precisão intra e inter-dia. A seletividade será avaliada preparando o limite inferior de quantificação (LLOQ) no plasma livre de drogas. Estabilidade (matriz biológica a -70 °C, temperatura de bancada à temperatura ambiente (20 ° C), 3 ciclos de congelamento e descongelamento e amostras processadas no amostrador automático) também serão avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3. Faixa de trabalho das curvas de calibração e concentração dos pontos controles para validação do método analítico.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Analito | Faixa de trabalho (ng/mL) | Pontos controles (ng/mL) |
| Tramadol  | 5 – 5000 | 15; 1000; 3750 |
| O-desmetiltramadol | 5 – 5000 | 15; 1000; 3750 |
| 4-metilaminoantipirina | 800 - 40000  | 2400;12000; 30400 |
| 4-aminoantipirina | 800 – 40000 | 2400; 12000; 30400 |
| metoprolol | 1000 | NA |

## Análise farmacocinética

Parâmetros farmacocinéticos para os fármacos e seus metabólitos serão calculados usando modelos não compartimentais com o software WinNonlin 6.2.1 (Pharsight, Mountain View CA, EUA, 2011). As variáveis observadas serão: a concentração plasmática máxima (Cmax), o tempo para atingir a Cmax (Tmax), a área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero até ao momento da última concentração mensurável (AUC0→t) e a extrapolação da AUC até ao infinito (AUC0→ ∞), volume de distribuição aparente (Vz/F), depuração aparente (CL/F), meia-vida de eliminação (T1/2); Tempo médio residual até o momento da última mensuração (MRT0→ t ), Tempo médio residual do momento zero até o infinito(MRT0→ ∞), o melhor modelo que descrever os dados farmacocinéticos individuais será ajustado.

## Análise estatística

A análise estatística será realizada utilizando o software Biostat versão 5.0 (Analysissoft Inc., Wanut, California). Em relação ao teste a ser aplicado, o mesmo será definido após análise de normalidade por meio do teste de Komogorov-Smirnov.

# RESULTADOS ESPERADOS

Esperamos com os resultados desse projeto sermos capazes de avaliar a farmacocinética da dipirona isolada, e de seus metabólitos, bem como a sua associação com o tramadol na espécie asinina. De posse desses parâmetros farmacológicos poderemos estabelecer a dosagem que melhor atenda a demanda desta espécie em processos álgicos.

Também esperamos analisar se a associação dos fármacos promoverá alguma mudança na farmacocinética de ambos, que possa significar ou propor modificações de dose e intervalo de administração

# CRONOGRAMA

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Atividades – ANO 1 - 2019** | **Mar** | **Abr** | **Mai** | **Jun** | **Jul** | **Ago** | **Set** | **Out** | **Nov** | **Dez** | **Jan** | **Fev** |
| Revisão de literatura | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Separação dos animais |  |  |  | X | X | X |  |  |  |  |  |  |
| Período de ambientação |  |  |  |  | X | X | X |  |  |  |  |  |
| Administração dos fármacos e coleta das amostras |  |  |  |  | X | X | X |  |  |  |  |  |
| Validação do teste analítico |  |  |  |  |  |  | X | X | X | X | X | X |
| Análises das amostras |  |  |  |  |  |  | X | X | X | X | X | X |
| **Atividades – ANO 2 - 2020** | **Mar** | **Abr** | **Mai** | **Jun** | **Jul** | **Ago** | **Set** | **Out** | **Nov** | **Dez** | **Jan** | **Fev** |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Análise estatística dos dados | X | X | X | X | X |  |  |  |  |  |  |  |
| Redação de manuscritos científicos | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |  |  |
| Defesa do doutorado |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | X |  |

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBIATI, Roberto Andrea et al. A physiologically based model for tramadol pharmacokinetics in horses. **Journal of theoretical biology**, v. 429, p. 46-51, 2017.

ALBERGHINA, Daniela et al. Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. **Journal of equine veterinary science**, v. 33, n. 6, p. 433-436, 2013.

AUPANUN, Sawinee et al. pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-methyl-amino-antipyrine and 4-acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (dipyrone) in Healthy Donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 47, p. 55-61, 2016.

AZARI, O. et al. Analgesic and sedative effects of caudal epidural tramadol in dromedary camels. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n. 1, 2019.

BANIADAM, Ali; AFSHAR, Fereidoon Saberi; AHMADIAN, Fakhredin. Analgesic effects of tramadol hydrochloride administered via caudal epidural injection in healthy adult cattle. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 7, p. 720-725, 2010.

BASAK, G. W.; DROZD-SOKOŁOWSKA, J.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. Update on the incidence of metamizole sodium-induced blood dyscrasias in Poland. **Journal of International Medical Research**, v. 38, n. 4, p. 1374-1380, 2010.

BORTOLAMI, E. et al. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 3, p. 404-409, 2015.

BURDEN, Faith; THIEMANN, Alex. Donkeys are different. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 376-382, 2015.

CAGNARDI, P. et al. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. **Research in veterinary science**, v. 90, n. 3, p. 503-509, 2011.

COOK, Vanessa L.; BLIKSLAGER, Anthony T. The use of nonsteroidal anti‐inflammatory drugs in critically ill horses. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 76-88, 2015.

COX, S.; VILLARINO, N.; DOHERTY, T. Determination of oral tramadol pharmacokinetics in horses. **Research in veterinary science**, v. 89, n. 2, p. 236-241, 2010.

DAI, Francesca et al. Welfare conditions of donkeys in Europe: initial outcomes from On-farm assessment. **Animals**, v. 6, n. 1, p. 5, 2016.

DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, Adriana Miriam et al. Effect of metamizol on morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and subchronic administration in arthritic rats. **European journal of pharmacology**, v. 645, n. 1-3, p. 94-101, 2010

EVENSON, Emily; MANS, Christoph. Antinociceptive efficacy and safety of subcutaneous tramadol in chinchillas (chinchilla lanigera). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 28, p. 98-104, 2019.

FLÔR, Patrícia B. et al. Tramadol plus metamizole combined or not with anti‐inflammatory drugs is clinically effective for moderate to severe chronic pain treatment in cancer patients. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 40, n. 3, p. 316-327, 2013.

GIORGI, Mario et al. Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites in healthy horses. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 165-171, 2017.

GIORGI, Mario et al. Pharmacokinetics of tramadol and its metabolites M1, M2, and M5 in donkeys after intravenous and oral immediate release single-dose administration. **Journal of equine veterinary science**, v. 29, n. 7, p. 569-574, 2009.

GIORGI, Mario et al. Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. **Small Ruminant Research**, v. 132, p. 143-146, 2015.

GROSENBAUGH, D. A.; REINEMEYER, C. R.; FIGUEIREDO, M. D. Pharmacology and therapeutics in donkeys. Equine Veterinary Education, v. 23, n. 10, p. 523-530, 2011.

HEDENMALM, Karin; SPIGSET, Olav. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). **European journal of clinical pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 265-274, 2002.

IBAÑEZ, Luisa et al. Agranulocytosis associated with dipyrone (metamizol). **European journal of clinical pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 821-829, 2005.

IMAGAWA, Vivianne H. et al. The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 38, n. 4, p. 385-393, 2011.

JASIECKA, A.; MAŚLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 17, n. 1, p. 207-214, 2014.

KIM, Tae Won et al. Pharmacokinetic profiles of metamizole (dipyrone) active metabolites in goats and its residues in milk. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 699-705, 2018.

LAVASANI, Hoda et al. Study of the pharmacokinetic changes of Tramadol in diabetic rats. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 17, 2013.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco Javier et al. Enhancement of antinociception but not constipation by combinations containing tramadol and metamizole in arthritic rats. **Archives of medical research**, v. 44, n. 7, p. 495-503, 2013.

MARZOK, Mohamed A.; EL‐KHODERY, Sabry A. Comparative analgesic and sedative effects of tramadol, tramadol‐lidocaine and lidocaine for caudal epidural analgesia in donkeys (*Equus asinus*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 42, n. 2, p. 215-219, 2015.

MATTHEWS, N. S., CARROLL, G. L. Review of equine analgesics and pain management. In **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners***,* Orlando, Florida (pp. 240-4), 2007.

MATTHEWS, N.; VAN LOON, J. P. A. M. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. **Equine Veterinary Education**, v. 25, n. 1, p. 47-51, 2013.

MCMILLAN, C. J. et al. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 4, p. 325–331, 2008.

MENDOZA, F. J. et al. Thyroid hormone concentrations differ between donkeys and horses. **Equine veterinary journal**, v. 45, n. 2, p. 214-218, 2013.

MORENO-ROCHA, Luis Alfonso et al. Effect of tramadol on metamizol pharmacokinetics and pharmacodynamics after single and repeated administrations in arthritic rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 6, p. 674-684, 2016.

MORENO-ROCHA, Luis Alfonso et al. Antinociceptive effects of tramadol in co-administration with metamizol after single and repeated administrations in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 1, p. 1-5, 2012.

NIKOLOVA, Irina et al. Metamizole: a review profile of a well-known “forgotten” drug. part I: pharmaceutical and nonclinical profile. **Biotechnology& Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 6, p. 3329-3337, 2012.

READ, Kate; KHATUN, Mahmuda; MURPHY, Helen. Comparison of transdermal fentanyl and oral tramadol for lateral thoracotomy in dogs: cardiovascular and behavioural data. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 46, n. 1, p. 116-125, 2019.

REGAN, Fran H. et al. Behavioural repertoire of working donkeys and consistency of behaviour over time, as a preliminary step towards identifying pain-related behaviours. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101877, 2014.

RODRÍGUEZ‐SILVERIO, Juan; ARRIETA, Jesús; FLORES‐MURRIETA, Francisco J. Synergistic interaction between tramadol and dipyrone in thermal paw stimulation model in the rat. **Drug Development Research**, v. 70, n. 6, p. 450-454, 2009.

SHEIKHOLESLAMI, Behjat et al. Evaluation of the route dependency of the pharmacokinetics and neuro-pharmacokinetics of tramadol and its main metabolites in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 55-63, 2016.

SOUZA, Marcy J.; COX, Sherry K. Tramadol use in zoologic medicine. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 117-130, 2011.

SUBEDI, Muna et al. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 443-451, 2019.

TAVANAEIMANESH, Hamid et al. Comparison of Analgesic Effects of a Constant Rate Infusion of Both Tramadol and Acetaminophen Versus those of Infusions of Each Individual Drug in Horses**. Journal of Equine Veterinary Science**, v. 64, p. 101-106, 2018.

UDEGBUNAM, Rita Ijeoma et al. Effects of two doses of tramadol on pain and some biochemical parameters in rabbits post-gastrotomy. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 783-790, 2015.

VAZZANA, M. et al. Tramadol hydrochloride: pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 70, p. 234-238, 2015.

ZANUZZO, Felipe S. et al. Analgesic and antihyperalgesic effects of dipyrone, meloxicam or a dipyrone–meloxicam combination in bitches undergoing ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 33-37, 2015.

ZARO, Débora et al. Pythiuminsidiosum em equino: Relato de caso. **PUBVET**, v. 12, p. 136, 2018.

# ANEXO 1

DESENHO EXPERIMENTAL