



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROJETO DE PÓS-DOUTORADO

**Monitoramento farmacoterapêutico de dipirona (metamizol) e
tramadol em asininos (*Equus asinus*)**

LILIAN GRACE DA SILVA SOLON

Profa. Orientadora: Profa. Dra. Valéria Veras de Paula

2019

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos opioides continuam sendo a escolha para o tratamento da dor de intensidade moderada a grave. No entanto, a utilidade desses fármacos no tratamento da dor crônica é limitada devido ao desenvolvimento de tolerância ao efeito analgésico que ocorre após repetidas administrações, resultando em aumento da dose administrada e, portanto, em maior incidência de efeitos adversos (DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, 2012). Uma estratégia comum para manter efeitos analgésicos adequados e reduzir os efeitos adversos é combinar doses de fármacos opioides, como o tramadol, com antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), como a dipirona (metamizol). Embora alguns estudos demonstrem que combinações entre opióides e AINEs possam produzir potenciação analgésica, pouco se sabe sobre os efeitos antinociceptivos de administrações repetidas, não havendo estudos de monitoramento farmacoterapêutico desses fármacos administrados simultaneamente em asininos (*Equus asinus*).

Metamizol e tramadol são fármacos analgésicos com mecanismos de ação complexos, amplamente utilizados em combinação no tratamento da dor aguda pós-operatória (POVEDA, 2003). O mecanismo farmacodinâmico para a interação entre metamizol e tramadol pode ser atribuído parcialmente à sua participação no sistema opioidérgico (LÓPEZ-MUÑOZ, 2013). Outros mecanismos, como a via GMP da l-arginina-NO-cíclica e a interação com os receptores do ácido N-metil D-aspartico, podem ser propostos para explicar o sinergismo antinociceptivo observado com a combinação desses medicamentos.

O tramadol é um medicamento analgésico central com baixa afinidade por receptores opióides. É metabolizado no fígado por duas vias principais: O-desmetilação para O-desmetiltramadol (M1) pelo CYP2D6 e N-desmetilação para N-desmetiltramadol (M2) pelo CYP2B6 e CYP3A4. Apenas um dos metabólitos do tramadol, M1, é farmacologicamente ativo. Sua seletividade para receptores μ foi demonstrada, mostrando uma maior afinidade por receptores opióides do que o fármaco original (SCOTT e PERRY, 2000). O metamizol é um medicamento antiinflamatório não esteroide que atua como

um agente analgésico e antipirético eficaz. O metamizol é um derivado da pirazolona que inibe a síntese de prostaglandinas nos níveis central e periférico (ALVES e DUARTE, 2002, ORTIZ, 2003). O metamizol é um pró-medicação que sofre hidrólise para produzir 4-metilaminoantipirina (MAA), que é transformada no fígado pelo citocromo CYP3A4 em 4-aminoantipirina (AA) e por oxidação em 4-formilaminoantipirina (FAA). O AA é acetilado em 4-acetilaminoantipirina (AAA) (LEVY, 1984). Seu principal efeito adverso é o risco de induzir agranulocitose. A incidência desta grave complicação tem uma grande variabilidade, que pode refletir predisposição genética (SCHUG; MANOPAS, 2007).

Estudos de monitoramento farmacoterapêutico são necessários quando há preocupação no surgimento de reações adversas em administrações repetidas de doses de fármacos isolados ou administrados simultaneamente (KANG, 2009). Este procedimento não consiste apenas em medir a concentração de um fármaco em uma matriz biológica, mas também envolve a interpretação adequada dos valores plasmáticos através de parâmetros farmacocinéticos, permitindo-se conclusões apropriadas sobre os medicamentos quanto às concentrações utilizadas e ajuste de dose. Através da administração simultânea em asininos, pode ser possível que o metamizol e o tramadol possam competir pelas mesmas enzimas, causando alterações nas concentrações dos metabólitos destes fármacos e, conseqüentemente, nos efeitos farmacológicos produzidos podendo levar à reações adversas graves. Dessa forma, torna-se necessário um estudo completo, que envolva o monitoramento farmacoterapêutico de tramadol e metamizol nestes animais.

2 Objetivos

Geral: Realizar monitoramento farmacoterapêutico de dipirona (metamizol) e tramadol em asininos (*Equus asinus*)

Específicos:

- Validar metodologia analítica por UHPLC-MS para a determinação das concentrações plasmáticas de tramadol, metamizol e seus respectivos metabólitos ativos;
- Avaliar o perfil farmacocinético do tramadol administrado de maneira isolada investigando a presença e a concentração dos metabólitos M1, M2 e M5;
- Avaliar o perfil farmacocinético do tramadol co-administrado com dipirona e investigar quanto à interação farmacológica, aumento e/ou diminuição dos metabólitos M1, M2 e M5 (do tramadol) e MAA e AA da dipirona;
- Monitorar as concentrações plasmáticas em administração repetida de doses e propor um regime posológico;
- Investigar se ocorre aumento das concentrações plasmáticas (acúmulo de fármaco e metabólitos) frente às administrações repetidas dos fármacos;
- Propor um protocolo de acompanhamento farmacoterapêutico para asininos (*Equus asinus*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

As condições do estudo serão submetidas à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA) e após aprovação, serão utilizados 08 jumentos (*Equus asinus*), adultos, raça nordestina. Serão incluídos no estudo somente os animais considerados saudáveis mediante avaliação clínica, incluindo exames complementares de hemograma completo e avaliação bioquímica hepática e renal.

Os animais serão desverminados e aclimatados em baias nas quais permanecerão durante a pesquisa e será fornecida dieta constituída de ração comercial e volumoso para nutrição e água *ad libitum*.

3.2 Desenho experimental

Serão utilizados 08 jumentos (*Equus asinus*) adultos com peso entre 100 e 150 Kg. Os asininos serão previamente aclimatados e avaliados quanto à higidez por meio de exame clínico e análise hematológica, parasitológica e bioquímica completa. Os mesmos animais serão submetidos a todos os tratamentos possuindo um período de descanso de 15 dias entre tratamentos.

Doze horas antes do início do experimento os animais serão submetidos a jejum alimentar e quatro horas antes haverá jejum hídrico. 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 sendo acoplado uma torneira de 3 vias.

Realizada a coleta de sangue controle (Branco), os asininos receberão repetidas doses do seguinte tratamento: 4mg.kg⁻¹ de tramadol (Tramadon[®], Cristália, SP - Brasil) e 25 mg.kg⁻¹ de metamizol (D500[®], Zoetis, SP- Brasil), co-administrados a cada 8 horas por via intravenosa lenta (2 min) e sendo a administração realizada pelo mesmo aplicador. Após a aplicação dos fármacos, amostras de 10mL de sangue serão coletadas em horários pré-definidos, antes e após a administração repetida da dose.

Durante este procedimento, haverá monitoramento dos efeitos adversos e reação comportamental dos animais, além da avaliação bioquímica renal e hepática.

3.3. Determinação das concentrações plasmáticas de tramadol, metamizol e metabólitos ativos

Após a administração do fármaco, serão colhidas 1mL de sangue venoso o qual será acondicionado em tubos contendo EDTA e posteriormente centrifugado a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, que será mantido a -80 °C para posterior análise da concentração plasmática e variáveis farmacocinéticas do tramadol, metamizol e seus metabólitos por meio de cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (UHPLC).

3.3.1. Condições analíticas

As concentrações plasmáticas serão analisadas em um sistema UHPLC-MS/MS (Nexera® 2 UHPLC) acoplado a um detector de espectrometria de massas LCMS-8040 (Shimadzu®, Japan) e coluna Shimadzu® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 75 mm) (Shimadzu®, Japan). A fase móvel será constituída por acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,1% (75:25, v/v) a 0,3 mL/min; o volume de amostra injetado será de 5,0 µL. A temperatura da coluna será ajustada para 40 °C e o amostrador automático regulado para 5 °C. Para Tramadol, M1, 4-MAA e 4-AA, o espectrômetro de massa será ajustado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), modo de ionização positivo ESI. A energia de colisão e a tensão do cone será 12 e 19 V, respectivamente. A taxa de fluxo do gás cone e dessolvatação calibrada 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 configurado para monitorar a transição da faixa do íon principal e íon filho, com tempo de permanência de 0,3 s. Dados de MRM serão adquiridos e analisados através do software Labsolution® (Shimadzu®, Japan).

3.3.2. Preparação das amostras

As amostras congeladas de plasma dos animais serão colocadas para descongelar naturalmente e posteriormente agitadas em vortex antes de sua utilização. O plasma será preparado por meio de extração em fase sólida, utilizando cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters Milford, MA, USA) e sistema a vácuo (Spe-ed Mate-10, Applied Separations, Allentown, PA, USA). Os cartuchos serão pré-condicionados por meio de lavagens com 6 mL de metanol e 6 mL de água destilada. 100 µL da amostra serão colocadas diretamente no cartucho e adicionados 100 µL da solução do padrão interno. A amostra será deixada em repouso durante 5 min, lavada com 0,4 mL de água e, em seguida, secada sob vácuo. Os analitos e o padrão interno serão eluídos com 3 mL de metanol, a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, sendo posteriormente evaporado em banho-maria a 45°C sob uma suave corrente de nitrogênio gasoso. O resíduo será reconstituído com 100 µL fase móvel e injetado em UHPLC/MS-MS para análise.

3.4. Validação do método

O método será validado, baseado nos critérios descritos na resolução nº166, de 24 de julho de 2017, ANVISA, Brasil.

- *Seletividade e linearidade.*

A seletividade do método será provada pela ausência de coeluição entre as substâncias endógenas, a dipirona, 4-methylaminoantipyrina, 4-aminoantipyrina e o padrão interno. Amostras de plasma branco normal e hemolisado não tratados serão utilizados para verificar a especificidade do método.

Para avaliar a linearidade das curvas de calibração, concentrações plasmáticas da dipirona serão calculados a partir de curvas padrão de plasma em branco enriquecida com concentrações conhecidas de dipirona (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL), 4-methylaminoantipyrina (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL) e 4-aminoantipyrina (1, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 100 µg/mL), analisados em triplicata. As curvas de calibração padrão serão

construídas com área sob o pico de dipirona/padrão versus a concentração nominal, por meio de regressão linear.

- Precisão, exatidão e recuperação.

Precisão do ensaio será avaliada através da determinação dos coeficientes de variação (CV) das quatro amostras controle (CQ) (Dipirona, MAA e AA - concentrações de 5, 15, 30 e 100 µg/mL) com a mesma análise (n = 5, precisão intra-dia) e ao longo de uma série de análises (n = 5, a precisão inter-dia). Tanto a precisão intra-dia e inter-dia será calculada com a seguinte fórmula:

$$CV\% = \left(\frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \right) \times 100$$

A precisão relativa será determinada através do cálculo da precisão por cento, pela equação:

$$\text{Acurácia \%} = \left(\frac{\text{Média da concentração mensurada}}{\text{Concentração nominal}} \right) \times 100$$

Será determinado o limite de quantificação (LLOQ). Os ensaios de recuperação neste estudo serão realizados comparando as áreas dos picos do padrão interno e da dipirona, MAA e AA em amostras plasmáticas, extraído segundo o método já descrito. Os compostos de interesse em concentrações correspondentes a 100% de recuperação serão adicionados de forma semelhante pós-extraída do plasma em branco.

- Estabilidade

A estabilidade da dipirona, MAA e AA em plasma felino será testada em três ciclos de congelamento-descongelamento com amostras de plasma branco enriquecido com quatro diferentes concentrações. Estas amostras serão armazenadas congeladas a -20 °C e analisada nos dias 0, 1 e 5.

3.5. Análises farmacocinéticas e estatísticas

A análise farmacocinética da dipirona e seus metabólitos será realizada de acordo com um método não compartimental, usando o software WinNonlin (PharsightCo., CA, versão 2.0). A concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo para que ela fosse estabelecida ($T_{\text{máx}}$) foram obtidas diretamente da observação dos dados. A AUC_t será calculada pelo método trapezoidal. O AUC_{inf} será calculado como $AUC_t + C_t / K_e$, onde C_t corresponde a última concentração quantificável, K_e a constante de velocidade de eliminação terminal de e será determinada por mínimos quadrados. A análise de regressão durante a fase log-linear terminal do curva de concentração-tempo. O $T_{1/2}$ será o valor obtido substituindo a fórmula $0.693/K_e$.

A análise estatística de variância (ANOVA) de AUC_t , AUC_{inf} e C_{max} serão calculados após transformação dos dados para os seus valores logarítmicas (ln). Usando a variância do erro (S^2), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) serão calculados.

4. ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO FARMACOTERAPÊUTICO PARA ASININOS (*Equus asinos*)

Será proposto um protocolo de acompanhamento farmacoterapêutico aos asininos assistidos pelo hospital de medicina veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), com base nos resultados de farmacocinética, reações adversas e monitoramento plasmático após administrações repetidas de doses. Neste protocolo será incluída também uma investigação quanto à tolerância do opioide pelo animal.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, Daniela P.; DUARTE, Igor DG. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **European journal of pharmacology**, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, 2002.

DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, Adriana Miriam et al. High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 71, p. 173-178, 2012.

KANG, Ju-Seop; LEE, Min-Ho. Overview of therapeutic drug monitoring. **The Korean journal of internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 1, 2009.

LEVY, M.; FLUSSER, D.; ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L. Plasma kinetics of dipyrone metabolites in rapid and slow acetylators. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 453–458, 1984.

LÓPEZ-MUÑOZ, F. J.; SORIA-ARTECHE, O.; LÓPEZ, J. R. M.; HURTADO Y DE LA PEÑA, M.; GARCÍA, M. C. L.; MORENO-ROCHA, L. A.; DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A. M. Antinociceptive activity of metamizol metabolites in a rat model of arthritic pain. **Drug Development Research**, v. 74, n. 5, p. 332–338, 2013.

POVEDA, Raquel et al. Interaction between metamizol and tramadol in a model of acute visceral pain in rats. **European Journal of Pain**, v. 7, n. 5, p. 439-448, 2003.

SCOTT, Lesley J.; PERRY, Caroline M. Tramadol. **Drugs**, v. 60, n. 1, p. 139-176, 2000.

SCHUG, S. A.; MANOPAS, A. Update on the role of non-opioids for postoperative pain treatment. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 1, p. 15–30, 2007.