

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA**

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DA METADONA POR VIA
ORAL EM CÃES**

NADIA CROSIGNANI OUTEDA

**PORTO ALEGRE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA**

**ESTUDO FARMACOCINÉTICO DA METADONA POR VIA
ORAL EM CÃES**

Autor: Nadia Crosignani

**Dissertação de Mestrado apresentada no Curso de
Pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Fisiologia**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Corrêa Natalini
Co-orientador: Profa. Dra. Teresa Dalla Costa

**Porto Alegre
2010**

"La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para que sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar."

Eduardo Galeano

Mais uma importante etapa vencida em
minha vida que dedico a meus pais,
Margarita e Leonel, por terem me ensinado,
sempre pelo exemplo, a lutar com esforço,
dedicação e perseverança.
Que eu possa estar sempre perto de vocês,
mesmo que pelo pensamento, pois assim
terei a certeza que continuam iluminando
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Orientador, Prof. Dr. Cláudio Correa Natalini pelo crédito a mim concedido e pela possibilidade de realizar este trabalho. Agradeço com gratidão a orientação e o incentivo à vida acadêmica.

À minha Co-orientadora, Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, agradeço muito pela sempre pronta disposição em auxiliar e pela oportunidade em trabalhar com tema tão relevante.

À Dra. Flávia Uchoa, agradeço de coração pela dedicação e compromisso, por doar-se ao projeto. Sem seu apoio este trabalho não teria sido possível

Agradeço de forma muito especial às Dras. Ilma e Irací pelo apoio e conselhos, fizeram com que eu sentisse a *calidez* de estar em casa.

Aos colegas Ruben, Enrique, Gonzalo, Luciana, César, Federico e Victoria pela amizade e ajuda durante todas as etapas da execução do projeto.

Ao Dr. Soto e Nemetchek, pela *hinchada* constante. À Dra. Medero, Verocay e Dr. Rodriguez, mentores da minha formação acadêmica.

Aos colegas de mestrado pelos momentos de descontração e por fazerem toda a diferença no dia a dia do Curso.

Aos amigos do Uruguai, obrigado pela compreensão nas ausências, pelas boas vindas e despedidas de cada mês, pelas horas de MSN e emails. Aos amigos da veterinária, genética e bioinformática: *gracias chicos!*

Ao meu querido Júnior, não só pela ajuda na fase final de redação, mas principalmente pela compreensão nos momentos difíceis onde tudo parece perdido, sempre tornava as coisas simples, com carinho em cada correção e em cada mensagem.

Aos meus pais, a quem dediquei este estudo, obrigado pelo apoio incondicional, por suportar meus momentos de *paranoiqueo*, pelos *tirones de orejas*, as *pascualinas* quando voltava e aconchego nesta etapa. Às minhas irmãs e sobrinhos, que, na distância, foram o motor para eu não desistir. Aos meus tios, Graciela y Bocho, por sempre acreditar em mim. Aos meus primos e irmãs brasileiras pela força e carinho.

Ao Brasil, pela possibilidade, à CAPES pela bolsa e apoio à pesquisa. A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, minha gratidão pela formação e ajuda.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Receptores opioides e mecanismo de ação.....	17
3.2 Metadona: estrutura química, farmacodinâmica e farmacocinética.....	19
3.2.1 Vias de administração.....	21
3.3 Variabilidade na resposta a Metadona: conceitos de farmacogenética.....	24
3.3.1 Fenótipos farmacogenéticos.....	27
3.3.1.1 Polimorfismos genéticos que afetam a biotransformação de medicamentos.....	27
3.3.1.2 Polimorfismos genéticos que afetam transportadores de medicamentos.....	28
3.4 Interações da Metadona com outros fármacos.....	33
3.5 Usos Clínicos da Metadona.....	34
3.6 Metadona em Medicina Veterinária.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Matérias-primas.....	38
4.2 Aparelhos e Equipamentos.....	38
4.3 Solventes e outros.....	39
4.4 Animais.....	39
4.4.1 Amostras de Sangue.....	39
4.5 Delineamento Experimental.....	40
4.6 Avaliação Farmacocinética.....	41
4.6.1 Metodologia Analítica.....	41
4.6.1.1 Adaptação da Metodologia Analítica.....	41
4.6.1.2 Preparação das Amostras de soro.....	42
4.6.1.3 Preparação das Soluções da Curva padrão.....	43
4.6.1.4 Validação da Metodologia Analítica.....	43
4.6.2 Avaliação do Perfil de Concentração Sérica versus Tempo.....	44
4.6.2.1 Análise não compartimental.....	44
4.6.2.2 Análise compartimental.....	45
4.6.3 Análise Estatística.....	47

4.7 Análise Genética.....	47
4.7.1 Extração de DNA.....	47
4.7.2 Amplificação.....	47
4.7.3 Eletroforese em poliacrilamida.....	48
4.7.4 Tintção.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Análise Genética.....	49
5.2 Validação Parcial da Metodologia Analítica por LC-MS/MS para Quantificação da Metadona em soro.....	50
5.2.1 Seletividade.....	50
5.2.2 Precisão.....	51
5.2.3 Exatidão.....	52
5.2.4 Linearidade.....	52
5.2.5 Limite de Quantificação.....	53
5.3 Avaliação Farmacocinética da Metadona.....	53
5.3.1 Avaliação Farmacocinética da Metadona após Dose i.v.....	54
5.3.2 Análise farmacocinético da Metadona em Comprimido Via Oral..	58
5.3.3 Análise Farmacocinética da Metadona Líquida Via Oral.....	62
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS.....	69
8 ANEXOS.....	82
ANEXO 1.....	83
ANEXO 2.....	85
ANEXO 3.....	86
ANEXO 4.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Região da sequência do gene <i>MDR1</i>	47
Figura 2. Gel de Poliacrilamida com a corrida dos 4 cães e os marcadores moleculares. A seta indica o lugar onde se encontra o <i>MDR1</i>	49
Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE para metadona e fentanil em soro de cães.....	50
Figura 4. Curva de calibração média para metadona em soro de cães determinada por CLAE.	53
Figura 5. Perfil da concentração sérica média de metadona após administração intravenosa de 0,5 mg/kg a cães Cocker Spaniel.....	54
Figura 6. Perfil modelado de concentração sérica média de metadona Metadona após administração intravenosa de 0,5 mg/kg em cães Cocker Spaniel (n = 4, média).....	57
Figura 7. Perfil da concentração sérica média de metadona após administração da dose de 0,5 mg/kg associada a cetoconazol (10 mg/kg p.o. c/12h, 2 doses) em cães Cocker Spaniel Inglês.....	59
Figura 8. Perfil da concentração sérica média de metadona líquida após administração da dose de 0,5 mg/kg bucal a cães Cocker Spaniel (n=3).....	63

Figura 9. Perfil da concentração sérica média de metadona líquida após administração da dose de 0,5 mg/kg esofágica a cães Cocker Spaniel (n=3).....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclaturas dos receptores opioides.....	17
Tabela 2. Agentes terapêuticos substratos e inibidores da GpP.....	31
Tabela 3. Parâmetros usados no espectrômetro de massas para detecção de metadona em soro canino, usando fentanil como padrão interno.....	42
Tabela 4. Desvios padrão relativos intradia das três amostras controle de qualidade utilizadas para a curva padrão de metadona em soro de cães.....	51
Tabela 5. Exatidão para as amostras de controle de qualidade utilizadas para curva padrão da metadona em soro de cães.....	52
Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona i.v. 0,5 mg/kg.	55
Tabela 7. Comparação entre modelos compartimental e não compartimental.....	57
Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos médios empregando modelo de 2 compartimentos aos dados séricos de metadona i.v. na dose de 0,5 mg/kg.....	58
Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona v.o. co-administrada associada a 10 mg/kg de cetoconazol v.o. (c/12h 2 doses).....	60

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona bucal.....64

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona esofágica.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

a. C.	antes de Cristo
ASC	área sob a curva
$ASC_{0-\infty}$	área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito
ASC_{0-t}	área sob a curva do tempo zero ao tempo "t"
Cl	<i>clearance</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
D.P.	Desvio Padrão
f	biodisponibilidade
GpP	glicoproteína-P
IASP	International Association for de Study of Pain
i.m.	intramuscular
i.v.	intravenoso
Hg	mercúrio
K_{10}	constante de velocidade de eliminação do compartimento central
K_{12}	constante de velocidade de distribuição do compartimento central para o periférico
K_{21}	constante de velocidade de distribuição do compartimento periférico para o central
LLOQ	limite inferior de quantificação
MDR1	gene de multirresistência a drogas
MRT	tempo de residência médio
MSC	critério de seleção do modelo

n	tamanho amostral
NMDA	receptor N-metil-D-aspartato
NPS	Neuropathic Pain Scale
p.o.	<i>per oros</i>
QCs	controle de qualidade
s.c.	subcutânea
$t_{1/2}$	tempo de meia-vida
$t_{1/2\alpha}$	tempo de meia-vida da fase de distribuição (compartimental)
$t_{1/2\beta}$	tempo de meia-vida da fase de eliminação (compartimental)
t_{MAX}	tempo para alcançar a concentração sérica máxima
VAS	Visual Analogue Scale
V_d	volume de distribuição
α	constante de velocidade da fase de distribuição
β	constante de velocidade da fase de eliminação
λ	constante de velocidade de eliminação (análise não compartimental)

RESUMO

Esta dissertação teve como objetivo determinar parâmetros farmacocinéticos da metadona utilizada por via oral em diferentes formas farmacêuticas. A metadona foi administrada i.v. e v.o. (líquido e comprimido) (0,5 mg/kg) em cães da raça Cocker Spaniel Inglês. Foi também utilizada metadona comprimido (0,5 mg/kg) associada a cetoconazol (10 mg/kg, duas doses). As concentrações séricas resultantes foram determinadas por LC-MS/MS, empregando-se metodologia validada. Os perfis plasmáticos individuais foram avaliados por abordagem não compartimental e compartimental, utilizando os softwares Excel[®] 2003 e Scientist[®] 2.01, respectivamente, para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, que foram comparados estatisticamente pelo teste Wilcoxon Rank-Sum e Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

Os perfis plasmáticos da metadona i.v. foram descritos pelo modelo de dois compartimentos e o da metadona oral, pelo modelo de um compartimento. Após a administração da metadona oral, todos os grupos apresentaram concentrações séricas, com exceção do grupo que utilizou o comprimido de metadona isoladamente. O grupo que utilizou solução de metadona apresentou concentrações significativamente superiores ao grupo que recebeu comprimido de metadona isolado, com detecção de níveis do fármaco aos 5 min. O grupo associado ao cetoconazol apresentou o fenômeno de duplo pico plasmático sérico. Estes resultados nos permitem sugerir que a utilização de comprimido de metadona apresenta reduzida absorção, alcançando níveis séricos não quantificáveis pela metodologia empregada. No entanto, quando co-administrada com cetoconazol ou como solução, concentrações séricas foram detectadas, o que nos permite concluir que a utilização de metadona em solução se apresenta como uma boa alternativa para a administração oral deste fármaco em cães.

Palavras-chave: Cão. Metadona. Farmacocinética. Oral.

ABSTRACT

To determine pharmacokinetic parameters of methadone used in different formulations and routes of administration in dogs. Methadone alone was administered iv, bucal, esophagic and v.o. (liquid and tablet) (0.5 mg/kg) in dogs English Cocker Spaniel. It was also used methadone tablet (0.5 mg/kg) associated with ketoconazole (10 mg/kg, two doses). The resulting serum concentrations were determined by LC-MS/MS, using a validated methodology. The serum concentrations were evaluated by noncompartmental and compartmental model using the software Excel ® Scientist ® 2003 and 2.01, respectively, to determine the pharmacokinetic parameters, which were statistically compared using the Wilcoxon Rank-Sum and Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$). The plasma profiles of methadone i.v. are described by the compartmental model and the oral methadone for a noncompartmental model. After administration of methadone, all groups presented serum concentrations but the group that used the pill alone. The group using the methadone solution had significantly higher concentrations when compared with the group that received methadone isolated v.o., and the drug was detected in 5 min. The group associated with ketoconazole showed the phenomenon of double peak plasma. The tablet formulation of methadone reduced the absorption to values not measurable by the method used, however, when co-administered with ketoconazole or as a liquid formulation, serum concentrations were detected. The liquid formulation is presented as a potential alternative to oral administration of methadone in dogs

Keywords: Dog. Methadone. Pharmacokinetic. Oral.

1 INTRODUÇÃO

A IASP ([International Association for the Study of Pain](#)) define a dor como uma "experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão presente ou potencial ou descrita em termos de tal dano". Na medicina veterinária, os fármacos utilizados para o tratamento da dor são os opioides, antiinflamatórios não-esteroidais, ciclo-hexaminas, agonistas alfa-2 adrenérgicos, antidepressivos, anticonvulsivantes, corticosteróides e anestésicos locais (NATALINI, 2007b).

A grande maioria dos analgésicos opioides é quimicamente relacionada a um grupo de compostos purificados da *Papaverum somniferum*, e e utilizada há milênios pela humanidade. Já em 5.000 a.C., os Sumérios cultivavam e extraíam o ópio. Há registros em papiros egípcios de 1550 a.C. da utilização deste opioide para acalmar crianças e para o tratamento da dor. Além disso, a mitologia grega refere-se ao uso dessa substância como anticonvulsivante e narcótico. Galeno popularizou seu uso nos seus preparados galênicos e em 200 d.C. eram vendidos em pontos de comércio. Os árabes foram grandes consumidores do ópio para tratamento de diarreias e distúrbios oculares, distribuindo-o para Pérsia, Índia e China. A cultura ocidental incorporou o uso de ópio 700 anos depois dos gregos antes de atos cirúrgicos em preparações associadas com licores, rum ou uisque. O cirurgião inglês James Moore (1749 - 1834) utilizou pela primeira vez o ópio como tratamento da dor pós-operatória, mas, foi em 1805 que o francês Frederick Serturmer isolou um principio ativo e o nomeou de morfina em memória ao deus grego dos sonhos: Morpheus (ARAGÓN-POCE et

al., 2002). O termo opioide é usado para descrever compostos que atuam em receptores opioides (TRESOT *et al.*, 2008). Além dos efeitos benéficos dos opioides, seus efeitos tóxicos e potenciais para dependência química também são conhecidos desde o início de sua utilização, o que estimulou a procura de gêneros sintéticos potentes com menos efeitos colaterais, promovendo, com isso, a síntese de compostos antagonistas opioides ou com propriedades agonistas/antagonistas que expandiram as opções terapêuticas (GUTSTEIN & AKIL, 2007).

O emprego de técnicas analgésicas diminui o estresse e conseqüentemente as respostas neuroendócrinas em paciente com dor aguda, prevenindo o fenômeno de neuroplasticidade, responsável pela dor crônica e intensa (LIVINGSTON & CHAMBERS, 2000).

1.1 Receptores opioides e mecanismo de ação

Os receptores opioides pertencem à superfamília de receptores acoplados à Proteína-G, referidos por meio de diferentes nomenclaturas com o uso de letras gregas, nomenclatura recomendada pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica, ou de acordo com um ponto de vista molecular (DHAWAN *et al.*, 1996) (Tabela 1).

Tabela 1. Nomenclatura dos receptores opioides

Nomenclatura farmacológica	Recomendação da IUPHAR	Nomenclatura da biologia molecular
δ	OP ₁	DOP
κ	OP ₂	KOP
μ	OP ₃	MOP

Um quarto receptor opioide foi descoberto e chamado de ORL₁ (receptor semelhante ao OP₁ adotando, hoje, as nomenclaturas de OP₄ (IUPHAR) e NOP (biologia molecular) (WONG & NEW, 2002).

Diferentes genes controlam cada um destes três primeiros receptores opioides, cada um constituído de uma porção extracelular N-terminal de 7 voltas helicoidais transmembrana e uma porção intracelular C-terminal. Uma vez que o opioide se acopla ao receptor, pode ativar diferentes tipos de proteína-G, inibindo a atividade da adenil-ciclase (adenosina monofostato cíclica), ativando correntes de potássio operadas por receptor ou inibindo fluxos de cálcio regulados por voltagem. Em nível pré-sináptico, a diminuição na entrada de cálcio tem como consequência menor liberação de neurotransmissores, o que, nas fibras espinhais do corno dorsal, inibirá a transmissão sináptica de estímulos nociceptivos. Na fenda pós-sináptica, sua ação ocorre por meio do fluxo de potássio, hiperpolarizando os neurônios espinais. Uma terceira possível forma de ação descrita é associada a neurônios gabaérgicos, atuando na regulação das vias descendentes antinociceptivas (GUTSTEIN & AKIL, 2007).

O sistema nervoso central possui receptores opioides em nível espinhal e supraespinhal, sendo também encontrados periféricamente nos plexos mioentéricos (aqui somente receptores OP₁ e OP₃) (DHAWAN, 1996; GUTSTEIN & AKIL, 2007).

Os opioides apresentam rápido início de ação em nível central após a administração parenteral, tanto por via intravenosa, intramuscular ou

subcutânea. Pela via oral, transdérmica, retal ou bucal, a absorção é variável, dependendo das características particulares do agente e do indivíduo (LAMONT & MATHEWS, 2007).

Os efeitos farmacológicos indesejáveis mais comuns dos opioides em cães são depressão, hipotermia, êmese, diminuição do reflexo da tosse, midríase, depressão da ventilação, bradicardia, espasmo, redução do peristaltismo intestinal e retenção urinária (LAMONT & MATHEWS, 2007). Tais efeitos indesejáveis podem ser minimizados com a utilização da via epidural ou subaracnóidea (NATALINI, 2007).

1.2 Metadona: estrutura química, farmacodinâmica e farmacocinética

A metadona é um opioide sintético agonista OP3, sendo também antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). É comercializada como uma mistura racêmica de dois enantiômeros: a forma R e a S. A primeira forma possui potência e afinidade com receptores opioides dez vezes maior do que a segunda; a forma S é responsável pela atuação nos receptores NMDA e inibição da recaptação de serotonina e norepinefrina (TRESOT *et al.*, 2008). Essas ações fazem com que a metadona seja um fármaco potencialmente vantajoso em dores neuropáticas severas e refratárias a outros opioides; Além disso, a inibição da recaptação de neuropeptídeos pode ser interessante para o tratamento de dor crônica e hiperalgesia (CODD *et al.*, 1995; GORMAN *et al.*, 1997; PERGOLIZZI *et al.*, 2008). Além do efeito benéfico da analgesia, a metadona apresenta efeitos indesejáveis como euforia, depressão respiratória e

arritmias cardíacas, porém com menor frequência em comparação com outros opioides (BRUERA & SWEENEY, 2002; Li *et al.*, 2008).

A metadona apresenta pH básico, é lipofílica, com pKa de 9,2, e possui alta ligação às proteínas plasmáticas inclusive a albumina, lipoproteínas e glicoproteínas (OLSEN, 1973). Além disso, possui distribuição tissular alta, produzindo reservas periféricas que irão manter concentrações plasmáticas durante tratamentos prolongados. Em humanos, a absorção gastrointestinal é alta, variando de 36 a 100% (GOURLAY *et al.*, 1986a; KRISTENSEN *et al.*, 1996; BRUERA & SWEENEY, 2002). Pesquisas em saúde sustentam que em um período de 2,5 a 4 horas após sua administração, consegue-se concentração plasmática máxima, com variação entre pacientes independentemente da dose (INTURRISI & VEREBELY, 1972; WOLFF *et al.*, 1993). Na forma de comprimido, observa-se que a absorção de metadona gera um segundo pico plasmático, provavelmente em consequência de uma recirculação entero-hepática (BELLWARD, 1977).

A metadona, quando administrada por via oral, está sujeita a importante metabolismo de primeira passagem no fígado e no trato gastrointestinal (Li *et al.*, 2008). Em humanos, sabe-se que ocorre metabolismo de primeira passagem no fígado, onde é biotransformada por desmetilação, obtendo o principal metabólito inativo, o 2-etileno-1,5 dimetil 3-3 difenilpirrolodina (EDDP), pelas enzimas CYP3A4, com participação da CYP2B6, e em menor importância a CYP2D6, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9 Y CYP2C19. Os produtos da biotransformação são todos inativos, nove deles são eliminados pela urina e, três, pelas fezes (KREEK

et al., 1980; Li *et al.*, 2008). Parte do fármaco circulante sofre filtração glomerular, sendo reabsorvido nos túbulos renais. O pH mais ácido é importante para uma maior depuração renal (BELLWARD *et al.*, 1977; EAP *et al.*, 2002).

A biotransformação hepática é determinada pela carga genética do indivíduo, gênero, idade e influências do meio ambiente, como dieta, estado patológico e uso concomitante de outras medicações. Drogas que interferem com o sistema das enzimas citocromo P450 podem alterar a farmacocinética da metadona, provocando alterações. Inibidores deste sistema de enzimas têm o potencial de aumentar os níveis sanguíneos de metadona, resultando em maior sedação e depressão ventilatória. Cabe ressaltar que a metadona pode também inibir o sistema P450 por saturação (TRESCOT *et al.*, 2008).

A biotransformação da metadona ainda não foi estudada em cães, portanto, não há informações sobre quais os sistemas enzimáticos envolvidos ou seus metabólitos (LAMONT & MATHEWS, 2007). Sabe-se que a CYP3A4 em humanos tem o CYP3A12 como ortólogo em cães. Os ortólogos entre espécies possuem relação na evolução, compartilhando identidades de aminoácidos e de substratos. No entanto, pode haver diferenças entre substratos de enzimas P450, o que causa importantes implicações quando procuramos extrapolar interações conhecidas de humanos para animais (TREPANIER, 2006).

1.2.1 Vias de administração da metadona

A metadona pode ser administrada por via oral (v.o), retal, intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) e subcutânea (s.c.), entretanto a última via não é

recomendada para humanos pela frequência de reações adversas locais (BRUERA & SWEENEY, 2002). Dale *et al.* (2002) estudaram a absorção nasal da metadona, comparando-a a intravenosa e a oral, e observou-se que, pela via nasal, existe absorção do fármaco comparável a uma meia-vida à intravenosa.

A via retal é uma opção, obtendo-se uma biodisponibilidade de 76% em indivíduos saudáveis, o que é considerado alto. Além disso, a absorção é mais rápida que a via oral (t_{MAX} 1,4 vs. 2,8 h) e com duração de ação prolongada (mínima de 10 horas) (DALE *et al.*, 2004).

A aplicação de opioides pela via epidural e subaracnóidea tem sido amplamente usada em medicina veterinária, evitando, assim, os efeitos indesejáveis observados quando aplicados por outras vias (NATALINI, 2007b). A metadona por estas vias tem um início de ação rápido por ser altamente lipossolúvel, causando menos depressão cardiorrespiratória em cães quando comparada com a via intravenosa na dose de 0,3 mg/kg (NOLAN, 2000).

A Organização Mundial da Saúde indica a via oral como a via de administração preferencial de medicamentos devido à segurança, não invasividade, custo, praticidade e efetividade (REISFIELD & WILSON, 2007). A administração sublingual de opioides permite uma absorção rápida por meio da mucosa oral, evitando o metabolismo hepático de primeira passagem. A cavidade oral em medicina humana oferece vários locais para absorção de fármacos: a mucosa bucal, gengival e sublingual, sendo a última a região mais permeável por ter uma menor espessura, alta irrigação e não ser queratinizada (SHOJAEI, 1998; REISFIELD & WILSON, 2007). Dentre os fatores que

influenciam na absorção transmucosa de um fármaco está sua característica a mais importante, a lipofílica, sendo esta fundamental para facilitar a passagem pela membrana da célula epitelial rica em lipídeos. O pH salivar tem um papel determinante na absorção e é influenciado por vários fatores como respiração oral, estado nutricional, idade, recente ingestão de água, vômito, quimioterapia, estomatite e secreção salivar (SHOJAEI, 1998; REISFIELD & WILSON, 2007).

Little *et al.* (2008), em experimento com cães, compararam a administração de fentanil por via gengival em uma preparação com carboximetilcelulose, com a via intravenosa, e observaram que os animais apresentaram níveis séricos detectáveis pela via transmucosa após 5 minutos, sem diferenças farmacocinéticas entre os grupos, a não ser após um tempo maior na detecção sérica de fentanil quando administrado na forma de gel.

Compostos bioadesivos de fentanil foram testados ex-vivo em membrana esofágica suína, e os resultados demonstraram uma possível via de administração: o sistema de liberação bucal (DIAZ DEL CONSUELO *et al.*, 2007).

Opioides hidrofílicos têm sido administrados por via sublingual, porém sem resultados positivos. No entanto, opioides lipofílicos apresentaram bons resultados, consistindo-se em uma alternativa para os animais, oferecendo vantagens como o baixo custo, menor desconforto na administração, e propiciando uma melhor aceitação pelo paciente, segurança e simplicidade. As desvantagens seriam a baixa palatabilidade, sensação de queimação e ulceração (REISFIELD & WILSON, 2007).

A metadona, além de ser lipofílica, apresenta alta biodisponibilidade sublingual em pesquisas com humanos, sendo uma alternativa para tratamento de episódios de dor oncológica pela rápida absorção e efeito imediato (HAGEN *et al.*, 2007). Weinberg *et al.* (1988) observaram um aumento significativo da absorção sublingual da metadona quando incrementaram o pH bucal de 6,5 para 8,5.

Não existem relatos da administração de metadona bucal em cães, nem estudos sobre sua farmacocinética por esta via. Linardi *et al.* (2009) estudaram a administração oral da formulação parenteral de metadona em equinos com doses de 0,1, 0,2 e 0,4 mg/kg, e a análise sérica demonstrou que o fármaco foi detectado nas três doses, com um perfil bifásico, rápida absorção e concentrações consistentes para analgesia, porém em outras espécies, foi observada variabilidade entre os animais nos parâmetros farmacocinéticos (NATALINI, 2007a; LINDARDI *et al.*, 2009). É importante salientar que em medicina veterinária fica difícil a utilização da via sublingual ou mesmo bucal, levando-se em conta a dificuldade de manter o fármaco em contato com a mucosa, pois, para a obtenção de níveis sanguíneos adequados, não pode haver, deglutição do fármaco .

1.2.2 Interações da metadona com outros fármacos

Embora polimorfismos genéticos possam ter grande influência na farmacocinética, na indução ou na inibição da biotransformação da metadona

são os fatores adicionais que explicam as variabilidades individuais (LI *et al.*, 2008).

A maioria dos grupos de fármacos são substratos indutores ou inibidores do complexo enzimático CYP, o que faz com que interações medicamentosas facilmente ocorram com a metadona.

Os antifúngicos são inibidores de várias isoenzimas do CYP, aumentando a concentração plasmática da metadona. Sabe-se que o cetoconazol é um potente inibidor da CYP3A4 em humanos, ocorrendo seu efeito já com duas doses (KUROHA *et al.*, 2002a,b). As enzimas ortólogas da CYP3A4 em cães são as CYP3A12 e CYP3A26, sendo que a CYP3A12 sofre inibição pelo cetoconazol (LU *et al.*, 2005). Interações com as enzimas CYP3A são difíceis de diferenciar das interações com a GpP, já que vários substratos dessa enzima são também substratos da GpP (TREPANIER, 2006).

Como a GpP é expressa nos enterócitos, pesquisadores têm comprovado, um aumento da absorção de seus substratos em humanos quando de sua inibição (DIETRICH *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2004). Taub *et al.*,(2005) demonstraram a inibição da GpP , com o uso de cetoconazol em um modelo ex-vivo de enterócitos de cães (TAUB *et al.*, 2005). Hugnet *et al.* (2007) estudaram os efeitos do cetoconazol na farmacocinética da ivermectina oral em cães. Essa interação resultou em um aumento significativo no tempo de permanência no plasma, de 3,8 a 5,8, no entanto, não foi definido se a redução da excreção da ivermectina foi ocasionada pela inibição da CYP ou da GpP (HUGNET *et al.*, 2007).

É importante salientar que a metadona é transportada pela GpP, e, portanto, que a indução ou a inibição dessa bomba de efluxo pode modificar significativamente suas propriedades farmacológicas.

1.3 Usos Clínicos da Metadona

A metadona é atualmente utilizada na clínica em humanos como agente para rotação de opioides, tratamento de refratariedade a opioides e dor neuropática (BRUERA & SWEENEY, 2002). Em vários países da Europa, a metadona é utilizada em associação com tranquilizantes para produzir sedação profunda em animais (NOLAN, 2000).

Em medicina humana, a metadona é uma alternativa para pacientes que apresentam sensibilidade aos efeitos secundários dos opioides, pois seus metabólitos são inativos, têm boa absorção pela via oral e retal, além do baixo custo (BRUERA & SWEENEY, 2002).

Aminoácidos excitatórios como o glutamato estão implicados no desenvolvimento de tolerância a opioides e dor neuropática. A metadona é um antagonista de receptor NMDA, o que lhe confere efetividade em dor neuropática (BRUERA & SWEENEY, 2002). Doses baixas de metadona foram avaliadas em pacientes com dor neuropática crônica que respondiam pouco aos tratamentos tradicionais. Houve diminuição na intensidade da dor e maior alívio desta pelas escalas VAS (*Visual Analog Scale*) e NPS (*Neuropathic Pains Scale*) (MORLEY *et al.*, 2003).

O vômito é um efeito colateral comum após administração de opioides com maior incidência nos fármacos que possuem características hidrofílicas. Esse efeito parece ser mediado por estimulação da zona quimiorreceptora de gatilho localizada fora da barreira hematoencefálica. No entanto, alguns opioides parecem ter um efeito anti-emético central, inibindo o centro do vômito; por conseguinte, opioides lipofílicos como a metadona poderiam ter tal efeito. Diante disso, nos casos em que há necessidade de tranquilizar um animal, sendo o vômito é uma situação indesejável, a metadona surge como uma opção viável, e, na associação a tranquilizantes, um efeito sedativo mais intenso pode ser obtido (MONTEIRO *et al.*, 2008; RAEKALLIO *et al.*, 2009).

1.4 Metadona Oral em Medicina Veterinária

Há informações na literatura sobre o uso de metadona por via parenteral em animais, entretanto, estudos de sua utilização enteral são escassos.

Maiante *et al.* (2008) compararam a dose de 1 mg/kg de morfina a 1 mg/kg e 0,5 mg/kg de metadona, ambas por via intravenosa em cães, havendo maior depressão cardiovascular com a metadona, porém na dose de 0,5 mg/kg a depressão desse sistema não foi tão intensa, concluindo-se, assim, que o efeito colateral cardiovascular desse fármaco é dose dependente. No entanto, Monteiro *et al.* (2009) compararam protocolos de neuroleptoanalgesia, associando acepromazina (0,05 mg/kg) com metadona (0,5 mg/kg), morfina (0,5 mg/kg), butorfanol (0,15 mg/kg) ou tramadol (2,0 mg/kg) por via intravenosa, tendo sido observada uma sedação maior na associação do fenotiazínico com a

metadona do que com os outros opioides. Neste estudo, o grupo que recebeu a associação com metadona foi o único que não apresentou hipotensão e bradicardia em comparação aos demais (MONTEIRO *et al.* 2009). Kukanich *et al.* (2005) administraram metadona por via oral a cães Beagle na forma de comprimidos sem obter concentrações plasmáticas, porém em associação ao cetozol, o opioide no plasma foi detectado em um dentre os seis cães aos quais foi administrado (KUKANICH *et al.*, 2005a). Em cães Greyhound, a metadona administrada pela via intravenosa apresentou um comportamento bifásico, com uma rápida distribuição, depuração alta ($56,04 \pm 9,36$ ml/min/kg) e meia-vida curta ($1,54 \pm 0,18$ h) (KUKANICH, 2008).

1.5 Conceitos de farmacogenética

Farmacogenética é o estudo das bases genéticas que influenciam na variação de resposta aos fármacos sendo esta considerada um fenótipo determinada por genes e pelo meio ambiente (RELLING & GIACOMINI, 2007). Para todas as classes de fármacos administrados em doses recomendadas, um número substancial de pacientes responde parcialmente ou não respondem, podendo também apresentar reações adversas. A concentração plasmática de um determinado fármaco na mesma dose pode variar mais de 600 vezes entre dois indivíduos que apresentem a mesma massa corporal. Essa variação pode ser genética, fisiológica, patofisiológica ou de origem ambiental. Absorção, distribuição, metabolismo e interações farmacológicas podem ser determinados geneticamente. Em geral, estima-se que os fatores genéticos determinem de 15 a 30% das diferenças individuais no metabolismo e na resposta aos

medicamentos. Porém, em alguns fármacos ou classe terapêuticas, os fatores genéticos podem atingir 95% da variabilidade interindividual na biodisponibilidade e efeitos terapêuticos (EICHELBAUM *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos de farmacogenética datam do final de 1950, quando foi demonstrado que uma deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase era causa de hemólise severa em alguns pacientes expostos à terapêutica contra malária (HOCHSTEIN, 1971), tendo sido demonstrado que a hemólise ocorre em maior escala em descendentes afro-americanos, em quem a deficiência da enzima é comum, e, raramente, em caucasianos descendentes de europeus.

O termo farmacogenômica se refere ao estudo do genoma completo e de como esse espectro de genes influencia o comportamento de compostos químicos. Por outro lado, a farmacogenética refere-se ao estudo de um gene e como este influencia a variabilidade interindividual de uma substância ou de um grupo farmacológico (DESMEULES *et al.*, 2004).

Efeitos adversos de fármacos aumentam a mortalidade e morbidade, e estão associados a custos consideráveis para o sistema de saúde. Nos Estados Unidos da América, estima-se que sejam responsáveis por mais de 100.000 mortes anuais, e representando 5% das admissões hospitalares. Fatores genéticos têm participação na patogênese das reações adversas previsíveis, portanto uma terapia baseada no perfil genético individual do paciente pode resultar não somente em resposta terapêutica superior, selecionando o fármaco e dose mais apropriada, mas também em redução nas falhas terapêuticas, efeitos secundários e toxicidade (EICHELBAUM, 2006).

Traço farmacogenético é qualquer característica mensurável associada a um fármaco, sendo exemplos a atividade enzimática, níveis plasmáticos do fármaco ou de metabólitos e parâmetros farmacodinâmicos. A avaliação direta de um traço (concentração plasmática de um fármaco) reúne as contribuições de todos os genes que o influenciam ao medir a característica fenotípica, tendo a desvantagem de também refletir influências não genéticas (interações farmacológicas, flutuações diurnas ou hormonais) (RELLING & GIACOMINI, 2007).

O polimorfismo é uma variação da sequência de DNA presente em uma frequência alélica igual ou superior a 1% em determinada população (RELLING & GIACOMINI, 2007). As diferenças das respostas terapêuticas entre os indivíduos geralmente estão associadas a polimorfismos genéticos presentes em genes que afetam a farmacocinética ou farmacodinâmica (METZGER *et al.*, 2006).

Em humanos, a farmacocinética da metadona tem uma variação interindividual extensa, caracterizada por uma distribuição ampla e uma fase de eliminação lenta (BRUERA & SWEENEY, 2002). Essa variabilidade é observada na relação entre a sua concentração e seu efeito farmacológico, por exemplo, em estudos que avaliam quadros algícos. Vários fatores têm sido identificados como causas potenciais deste fenômeno, sendo o polimorfismo genético um contribuinte primário (Li *et al.* 2008).

1.5.1 Fenótipos farmacogenéticos

Os possíveis genes envolvidos nas respostas terapêuticas e adversas podem ser divididos em três grupos: farmacocinéticos, receptor/alvo e modificadores da doença. Os genes que codificam para determinantes da farmacocinética de um fármaco, principalmente para enzimas e para transportadores, afetam suas concentrações, consistindo em determinante importante das respostas terapêuticas e adversas às substâncias (RELLING & GIACOMINI, 2007).

1.5.1.1 Polimorfismos genéticos que afetam a biotransformação de medicamentos

Polimorfismos nos genes de enzimas que participam do metabolismo podem afetar as reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e as reações de fase II (reações de conjugação, acetilação, glicoronidação, sulfatação e metilação). Vários medicamentos usados na clínica são biotransformados por enzimas que exibem polimorfismos genéticos, particularmente as isoformas do complexo das citocromo P450. Esses polimorfismos determinam diferentes perfis metabólicos, caracterizando os fenótipos em biotransformadores lentos, rápidos e intermediários, sendo que os lentos são aqueles que possuem uma ausência ou diminuição da concentração de enzima biotransformadora, o que predispõe o paciente a sofrer efeitos indesejáveis na terapêutica, por poder levar a quadros tóxicos.

Indivíduos biotransformadores rápidos podem apresentar aumento na produção da enzima biotransformadora associada a uma ou múltiplas duplicações do gene que codificam a enzima, com conseqüente ineficiência nas doses recomendadas, não sendo obtidos os benefícios do medicamento devido à diminuição nos níveis plasmáticos. Os intermediários correspondem à maioria da população, e, a eles, as pesquisas apontam quando da procura de uma dose para um novo fármaco (METZGER, 2006).

1.5.1.2 Polimorfismos genéticos que afetam transportadores de medicamentos

Até há pouco tempo, a absorção de compostos, a partir do trato gastrointestinal era considerada um processo passivo dependente do tamanho da partícula, solubilidade, lipossolubilidade, pKa e pH do fluido intestinal (EICHELBaum, 2006). Hoje, sabe-se que vários medicamentos são substratos de transportadores, que importam e exportam compostos endógenos e exógenos nas barreiras biológicas, mantendo a homeostase celular. Os transportadores se localizam principalmente nas células intestinais, hepáticas, do epitélio renal e barreira hematoencefálica, e são responsáveis pela absorção, biodisponibilidade e excreção de vários fármacos. Polimorfismos conhecidos alteram a expressão ou a conformação desses transportadores, o que pode resultar em alterações nos processos de absorção e de eliminação de medicamentos (METZGER, 2006).

Para ultrapassar as barreiras biológicas e chegar ao tecido alvo, analgésicos de ação central e outros xenobióticos biologicamente ativos compartilham a característica comum de lipossolubilidade e permanecem (parcialmente em muitas ocasiões) ionizados no pH fisiológico. A maioria dos fármacos e de seus metabólitos penetra as células por difusão passiva, no entanto, algumas dessas são difundidas ativamente por proteínas transportadoras de membrana que atuam como bombas de efluxo para remover xenobióticos da célula. Um desses transportadores é a glicoproteína-P (GpP), produto do gene de multiresistência a múltiplas drogas (*MDR1*), uma proteína transmembrana que atua exportando ativamente substratos do espaço intracelular para o extracelular (DESMEULES, 2004; MEALEY, 2004; NATALINI *et al.*, 2006). A expressão da GpP no fígado, rins, intestino e células endoteliais das barreiras hematoencefálica e placentária resulta em uma reduzida absorção no trato gastrointestinal, aumento da eliminação pela bile e pela urina e interrupção da entrada de certas substâncias no sistema nervoso central (IEIRI *et al.*, 2004). A expressão da GpP no intestino é amplamente reconhecida como um determinante para uma baixa absorção e menor biodisponibilidade de vários fármacos (LINARDI & NATALINI, 2006). Células neoplásicas expressam ativamente a GpP, o que desenvolve uma resistência aos quimioterápicos usados, muitas vezes de forma dose dependente. A presença da GpP nas células tumorais tem sido relacionada a um comportamento biológico alterado com consequências muitas vezes nocivas, por exemplo, à facilitação na disseminação do tumor (BELLAMY, 1996).

Vários são os substratos da GpP em medicina veterinária e vários permanecem inexplorados. Na Tabela 2, observam-se fármacos substratos dessa proteína de uso comum na clínica. A metadona suprime completamente a atividade GpP, no entanto, outros opioides como o fentanil inibem parcialmente sua ação (DESMEULES, 2004). A maioria dos substratos da GpP é também substratos de algumas das enzimas do complexo CYP (BOUËR *et al.*, 1999; NATALINI *et al.*, 2006).

Tabela 2. Agentes terapêuticos substratos e inibidores da GpP (MEALEY, 2004; LINARDI & NATALINI, 2006).

SUSTRATOS		INIBIDORES	
Antiácidos	Antagonista receptor β-adrenérgico	Immunosupresores	Verapamil
Cimetidina	Bunitrolol	Ciclosporina A	Quinidina
Ranitidina	Carvedilol	Sirolimus	Valspodar
	Celiprolol	Tacrolimus	Ciclosporina
Antibióticos	Talinolol		Cetoconazol
Eritromicina	Reserpina	Opióides	
Tetraciclina		Loperamida	
Rifampicina	Bloqueadores dos canais de Cálcio	Domperidona	
Levofloxacina	Verapamil	Morfina	
	Diltiazem	Pentazocina	
Antieméticos	Mibefradil	Metadona	
Ondasentrona		Asimadolina	
	Antiarrítmicos	Fentanil	
Agentes antitumorais	Digotoxina		
Paclitaxel	Digoxina	Esteróides	
Doxorrubicina		Dexametasona	
Daunorrubicina	Antagonistas receptor H1	Metilprednisolona	
Vinblastina	Fexofenadina	Aldosterona	
Vincristina	Terfenadina	Progesterona	
Actinomicina D		Hidrocortisona	
Docetaxel	Inibidores das Proteasas do HIV	Cortisol	
Etoposida	Amprenavir	Corticosterona	
Imatinib	Indinavir		
Teniposida	Nelfinavir	Outros	
	Saquinavir	Colchicina	
	Ritonavir	Intraconazol	
		Fenotiacinas	
		Ivermectina	
		Vecurônio	
		Amitriptilina	

A função comumente aceita da GpP é a de reduzir o acúmulo intracelular de xenobióticos mediante efluxo ativo, diminuindo o nível efetivo do fármaco no tecido alvo (DESMEULES, 2004).

Pesquisas compararam a biodisponibilidade pela via oral de substratos da GpP, estudando ratos *knockout* para o *MDR1* (-/-) e ratos com o gene selvagem. Os resultados mostraram maior absorção nos ratos mutantes (sem expressão da GpP), e, dentre os fármacos testados, foi incluído um do grupo dos opioides (SCHINKEL *et al.*, 1995). Em seres humanos, a concentração máxima detectada em plasma após a administração oral de morfina e de metadona foi maior quando pré-tratados com um inibidor da GpP (KHARASCH *et al.*, 2003; KHARASCH *et al.*, 2004). Esses resultados indicam que a GpP expressa em células epiteliais intestinais tem um papel preponderante na limitação da absorção de vários fármacos em humanos e roedores. Um modelo *in vitro* usando intestino invertido de rato comprovou que a absorção de metadona no intestino delgado é modificada pela ação do transportador da membrana apical do enterócito (GpP) e pelo metabolismo microssomal da enzima CYP3A4 (BOUËR, 1999).

A linhagem de cães da raça Collie apresenta, em alguns indivíduos, uma susceptibilidade extrema às drogas substratos da GpP, sendo a ivermectina um exemplo disto (NATALINI *et al.*, 2006). Mealey *et al.* (2001) investigaram cães sensíveis à ivermectina, e observaram que alguns eram homozigotos para uma deleção de 4 pares de bases no quarto exon do gene *MDR1*. Essa deleção gera códon de parada prematuros, terminando a síntese da proteína em menos de 10% do produto, o que se traduz, em cães homozigotos, em mutação em uma nulidade da expressão da GpP, similar ao que acontece nos ratos *knockout* para *MDR1* (-/-) (MEALEY *et al.*, 2001; MEALEY 2006). O alelo mutante foi

detectado em outras raças de cães: Whippet de pelo longo, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog, Silken Windhound, Australian Sheepdog, McNab, Elo, White Swiss Shepherd (HUGNET *et al.*, 2004; NEFF *et al.*, 2004; GEYER *et al.*, 2005b; FECHT *et al.*, 2007; GEYER *et al.*, 2007).

A frequência dessa mutação foi determinada na França em cães da raça Collie, nos quais 32% foram heterozigotos para a mutação (carregadores), e 48% resultaram homozigotos para a mutação (HUGNET *et al.*, 2004). Geyer *et al.* (2005a) determinaram a porcentagem de homozigotos mutantes na Alemanha para cães Collie (33,0 %), Australian Shepherd (6,9 %) e Shetland Sheepdog (5,7 %). A alta porcentagem de animais mutantes das raças carregadoras demonstra a importância do estabelecimento de bases para a manipulação do gene e sua expressão para seu uso farmacoterapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar parâmetros farmacocinéticos da administração de metadona v.o em cães, utilizada em diferentes formas farmacêuticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o gene *MDR1* e a ausência de alelos mutantes nos cães estudados;
- Adaptar metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) desenvolvida por MUSSHOF *et al.* (2005) e validada por KUKANICH *et al.* (2005), procedendo a uma validação parcial para dosagem de metadona em soro de cães;
- Avaliar o perfil plasmático *versus* tempo da metadona após a administração de 0,5 mg/kg i.v. e determinar os parâmetros farmacocinéticos;
- Comparar a farmacocinética da metadona em comprimido administrada isoladamente com a forma líquida bucal e esofágica e também a forma comprimido associada ao cetoconazol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos

- Cloridrato de Metadona: Metadon comprimido (10 mg) (Cristália[®])
- Metadona: Metadon injetável (10 mg/ml) (Cristália[®])
- Cetoconazol: Nizoral comprimido (200 mg) (Janssen-Cilag[®])

3.2 Equipamentos e ferramentas

- Programa Excel[®] 2003 (Microsoft[®])
- Programa Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®])
- Programa MassLynx[®] (Waters[®] Corporation)
- Programa Stata/IC 11.0 (Stata[®])
- Coluna cromatográfica: XDB-C8 (Agilent[®] Eclipse)
- Pré-coluna: Shimatzu[®] C8
- Fonte de poder: Power Pac 3000 (Bio-Rad[®])
- Cuba de eletroforese: Mighty Small SE250/SE260 (Hofer[®])
- Centrífuga: Hermlez 206^a (Labnet[®])
- Termocilador: MultiGenell (Labnet[®])
- Centrífuga a vácuo: RC 10.10 – RCT 90 (Jouan[®])
- Centrífuga de tubos: MR-23 (Jouan[®])
- Agitador de tubos: Finemixer SH2000 (Digger[®])
- Espectrômetro de massas: Quatro LC (Micromass[®])
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência: marca Shimadzu com os seguintes componentes:
 - o Controlador SCL 10A
 - o Bomba LC 10AD
 - o Degasificador DGU 14^a
 - o Autosampler SIL 10AD
 - o Forno CTO 10^a

3.3 Reagentes e outros

- Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milli Q[®] - Millipore)
- Acetato de Etila p.a. (Nuclear[®])
- Metanol grau CLAE (Omnisolv[®])
- Ácido tricloroacético (Merck[®])
- Cateter com sistema fechado 20 G BD[®] Saf-T-Intima
- Primers
- dNTPs: Sigma[®] Chemical Company
- Trizma: Sigma[®] Chemical Company
- EDTA: Sigma[®] Chemical Company
- Bisacrilamida 29:1: Fluka[®]
- TEMED: Gibco[®] Invitrogen
- Indicadores de pH em fita: Universalindikator pH 0-14 (Merck[®])

3.4 Animais

Neste estudo, foram utilizados quatro cães da raça Cocker Spaniel Inglês (dois machos e duas fêmeas), pesando entre 10 e 12 kg, clinicamente hígidos, com idades variando de seis a oito anos. Os animais foram provenientes da Unidade de Experimentação de Nutrição Canina (UNEC) do Departamento de Nutrição da Faculdade de Veterinária da Universidad de la República em Montevideu, Uruguai, e permaneceram em canis coletivos onde foram alimentados com ração comercial própria para a espécie e água *ad libitum*.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Bioética do Hospital das Clínicas de Porto Alegre.

3.4.1 Seleção dos Animais: Análise genética

3.4.1.1 Extração de ADN

Realizou-se a extração de ADN pela técnica de Chelex 100 (Walsh *et al.*, 1991). Quatro lavados com água destilada estéril (400 µL) foram feitos em 50 µL de sangue, e a seguir foram adicionados 200 µL de Chelex em suspensão a 5%. Posteriormente, colocou-se no termociclador por 30 minutos a 56°C e, em sequência, 15 minutos a 99°C.

3.4.1.2 Amplificação

Amplificou-se uma região do gene *MDR1* que inclui o lugar onde se faz presente a mutação *mdr-1Δ*, utilizando *primers* descritos por Neff *et al.*, 2004 (Figura 1).

```
181 atgttcgct attcaaattg gcttgatagg ttgtatatgt tggtggggac aatggctgcc  
241 atcatcatg gagctgcact ccctctcatg atgctggttt ttggaaacat gacagatagc  
301 ttgcaaattg caggaatttc aagaacaaaa actttccag ttataattaa tgaaagtatt
```

Figura 1. Região da sequência do gene *MDR1*. **Negrito:** regiões onde hibridizam os *primers*. Marcou-se as bases que sofrem deleção.

Para realizar as amplificações por PCR, foram utilizados os seguintes programas:

Desnaturalização: 95°C, 4 minutos, na presença de (por amostra):

- Buffer pH8 2,5 µL
- MgCl₂ 0,75 µL
- dNTPs 2 µL
- Primers 2 µL sense,
 2 µL antisense
- H₂O 14,6 µL
- Taqpolimerase 0,15 µL

35 ciclos:

- 94°C, 4 minutos
- 94°C, 30 segundos
- 56°C, 30 segundos
- 72°C, 45 segundos

3.4.1.3 Eletroforese em poliacrilamida

Para a eletroforese, utilizou-se 10 mL de bisacrilamida 29:1, com 100 µL de persulfato de amônio e 10 µL de TEMED. A corrida foi feita a 120 volts por 30 minutos com TBE 1x como buffer.

3.4.1.4 Coloração

Colocou-se a poliacrilamida por 10 minutos em fixador composto por água, etanol e ácido acético. Depois de enxaguar com água, colocou-se por 20 minutos em nitrato de prata, e lavou-se novamente com água. O revelador foi a solução usada na sequência para depois parar a reação com o fixador e, finalmente, lavar com água destilada.

3.5 Amostras de sangue

Uma semana antes do experimento foram colhidos 5 mL de sangue de cada cão para a tipificação genética e para realização de hemograma completo e perfil bioquímico hepático e renal.

Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas antes da realização do experimento. Duas horas após a administração da metadona, eram oferecidas ração e água. Todos os experimentos foram iniciados às 8 horas da manhã.

As amostras para o perfil farmacocinético foram colhidas por meio de um cateter 20G (BD Saf-T-Intima) previamente fixado percutâneo com duas entradas: em uma entrada a metadona era injetada, e, pela outra, eram feitas as coletas seriadas. Entre um grupo e outro houve um tempo de espera mínimo de 72 horas.

Para as coletas das amostras sanguíneas, em primeiro lugar 3 mL de sangue eram retiradas; em seguida, com uma nova seringa, coletavam-se 4 mL que eram transferidos para tubos com gel. Posteriormente, devolvia-se o sangue retirado em primeiro lugar seguido da injeção de solução fisiológica heparinizada (1 U.I./ml).

Logo após, as amostras de sangue eram centrifugadas a 1600 x g, e o soro acondicionado em *Eppendorfs* e congelado a -20 °C até o dia do processamento.

3.6 Desenho experimental

Os quatro cães participaram de cinco sessões de experimento, cada uma correspondendo a um grupo experimental.

Após a tricotomia da região correspondente à veia cefálica, foi inserido, de forma percutânea, um cateter com sistema fechado protegido com bandagem. Posteriormente, a metadona foi administrada nas seguintes formas:

- Injeção intravenosa pela veia cefálica (0,5 mg/kg);
- Líquido (formulação injetável) via bucal (0,5 mg/kg);
- Líquido (formulação injetável) por gavagem (0,5 mg/kg);
- Comprimido v.o. (10 mg – 0,5 mg/kg);
- Comprimido v.o. (10 mg – 0,5 mg/kg) com duas administrações prévias de cetoconazol (200 mg, 12,5 e 0,5 horas antes da metadona).

Para administração de metadona líquida, para todas as vias, procedeu-se à diluição do fármaco com água bi-destilada, visando a garantir o mesmo volume de administração (0,6 ml). No grupo que recebeu o fármaco bucal, o pH oral foi previamente determinado em cada animal com fitas indicadoras. Os animais receberam comprimidos com subsequente administração de 20 ml de água. Para a administração do fármaco no esôfago, foram usadas sondas umbilicais introduzidas pela cavidade oral.

Em todos os animais, foi coletado o tempo zero (antes de administrar o opioide). As coletas com administração intravenosa e bucal foram feitas nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 240 e 360 minutos. Para as outras formas de administração, foram excluídos os tempos de 5 e 10 minutos.

3.7 Avaliação Farmacocinética

Para avaliação do perfil farmacocinético das concentrações de metadona em soro, mediante análise não compartimental e compartimental, utilizaram-se os programas Excel[®] 2003 (Microsoft[®]) e Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]), respectivamente. O doseamento da metadona nas amostras de soro foi realizado por LC-MS/MS conforme descrito a seguir.

3.7.1 Metodologia Analítica

3.7.1.1 Adaptação da Metodologia Analítica

Todas as amostras foram processadas no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade do Rio Grande do Sul. A partir da metodologia analítica por cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) descrita por MUSSHOF e colaboradores (2005) e validada por KUKANICH *et al.* (2005), foram determinadas condições cromatográficas para detecção da metadona em soro. O equipamento usado foi o LC Shimadzu[®] em *tandem* com espectrômetro de massas Micromass[®].

As condições escolhidas incluíram o uso de coluna cromatográfica C8 de 3 x 150 mm, 5 µm (XDB-C8 Agilent[®] Eclipse) e pré-coluna Shimadzu C8. A fase móvel foi composta por metanol e água (90:10, v/v), fluxo de 0,5 mL/min, temperatura de forno de 30 °C, temperatura de fonte de 130 °C e temperatura de dessolvatação de 350 °C. Os fluxos de gás de nebulização e dessolvatação foram de 75 e 750 L/h, respectivamente.

O espectrômetro de massas foi usado no modo eletrospray positivo com os parâmetros sendo apresentados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Parâmetros usados no espectrômetro de massas para detecção de metadona em plasma de cães usando fentanil como padrão interno

Composto	Íon molecular (m/z)	Fragmento Filho (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
Metadona	310,1	265	25	35
Fentanil (PI)	337,1	188	25	35

Para a quantificação dos níveis de metadona, monitorou-se a transição m/z 310,1 a 104,7 e para a quantificação dos níveis de fentanil, m/z 337,1 a 188.

3.7.2 Preparação das amostras de soro

Amostras de 500 µL de soro com 10 µL de solução de padrão interno (PI, fentanil) tiveram as proteínas precipitadas com adição 5 mL de acetato de etila e posterior mistura no agitador de tubos por 5 min. Após, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C e congeladas a -80 °C por 5 min. O sobrenadante foi transferido para tubos de centrifuga, evaporou-se o conteúdo em centrifuga a vácuo (2 horas), para, finalmente, ressuspender em 200 µL de metanol. As amostras foram injetadas no LC-MS/MS no volume de 50 µL.

3.7.3 Preparação das soluções da curva padrão

Para a curva padrão, foi solubilizada metadona base em soro de cão, resultando em uma solução mãe de 200 µg/mL, sendo submetida a sucessivas diluições em soro até ser alcançada a faixa de 3 a 200 µg/mL. O padrão interno (PI) foi feito com sal de fentanil diluído em metanol e água, obtendo uma solução mãe de 600 µg/mL para uma concentração final em soro de 200 ng/ml. Alíquotas de 10 µL das soluções finais de metadona e do PI foram adicionadas a 490 µL

de soro e agitadas no vórtex por 10 segundos. Posteriormente, cada ponto da curva padrão foi submetido à extração líquido-líquido conforme descrito no item 4.6.3 para posterior análise no LC-MS/MS.

3.7.4 Validação parcial da metodologia analítica

A metodologia analítica desenvolvida foi validada parcialmente de acordo com o preconizado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2001), avaliando-se seletividade, exatidão, precisão intradia e limite inferior de quantificação.

A faixa de concentrações dos analitos na curva de calibração foi determinada a partir de estudos-piloto em cães a fim de representar as concentrações esperadas nas amostras.

A metodologia foi validada em soro, contemplando a faixa de concentração de 3 a 200 µg/mL (3, 12, 25, 50, 150, 200 µg/mL) com controles de qualidade de 180, 90 e 9 µg/mL. A validação parcial compreendeu três curvas injetadas consecutivamente, avaliando-se linearidade e limite inferior de quantificação. Análise de variância foi empregada para análise estatística da linearidade e de desvio da linearidade. Os controles de qualidade foram avaliados nos parâmetros de precisão intradia e exatidão.

3.7.5 Avaliação não compartimental do perfil sérico da metadona

Os perfis séricos de metadona foram avaliados por abordagem não compartimental. Foram determinados os parâmetros biodisponibilidade absoluta, depuração, tempo de meia-vida, volume de distribuição e tempo de residência médio, utilizando-se as equações listadas abaixo (GIBALDI E PERRIER, 1982).

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo de cada animal, empregando-se os últimos três pontos dos perfis. A partir do valor de λ determinado, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da metadona foi determinado pela equação 1:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (1)$$

A área sob a curva foi calculada pelo método trapezoidal dos tempos 0 a t (ASC_{0-t}), em que t é o último tempo de coleta. Essa área foi acrescida da área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}), sendo então denominada $ASC_{0-\infty}$, conforme equações 2 e 3.

$$ASC_{0-t} = \frac{(C_0 + C_1)}{2} \times (t_1 - t_0) + \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{(C_{t-1} + C_t)}{2} \times (t_t - t_{t-1}) \quad (2)$$

$$ASC_{ext} = \frac{C_t}{\lambda} \quad (3)$$

A depuração foi estimada pela equação 4, em que D é a dose administrada, e f é a biodisponibilidade absoluta em relação à metadona i.v.

$$Cl = \frac{f \times D}{ASC_{0-\infty}} \quad (4)$$

A área sob a curva do primeiro momento ($ASMC_{0-\infty}$) foi determinada pelo método trapezoidal (equações 5 e 6):

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{(C_0 \times t_0) + (C_1 \times t_1)}{2} \right) \times (t_1 - t_0) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} \times t_{t-1}) + (C_t \times t)}{2} \right) \quad (5)$$

$$ASMC_{ext} = \left(\frac{C_t \times t}{\lambda} \right) + \left(\frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad (6)$$

O tempo de residência médio (MRT) foi calculado a partir dos valores de $ASC_{0-\infty}$ e $ASMC_{0-\infty}$ (equação 7).

$$MRT_{i.v.} = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (7)$$

A biodisponibilidade absoluta (f) foi determinada pela relação entre $ASC_{0-\infty}$ após dose não sistêmica (oral ou bucal) e $ASC_{0-\infty}$ i.v.

3.7.6 Análise compartimental

A análise compartimental foi feita avaliando-se o modelo farmacocinético que mais se ajustava aos dados experimentais. A qualidade da modelagem foi avaliada pelo ajuste visual dos pontos experimentais aos perfis obtidos por meio dos modelos empregados, pelo coeficiente de correlação (r) e pelo critério de seleção do modelo (MSC), calculado pelo Programa Scientist[®]. O MSC representa a adequação do modelo proposto para descrever os dados experimentais. Assim, quanto maior seu valor, mais adequado é o modelo para descrever os pontos obtidos experimentalmente.

Para descrever os dados após administração i.v., o modelo escolhido foi o de dois compartimentos abertos (equação 8) (SHARGEL *et al.*, 2004), onde C_p é a concentração sérica para cada tempo, “a” e “b” são os interceptos das fases de distribuição e eliminação, respectivamente, e α e β são as velocidades das fases de distribuição e eliminação:

$$C_p = a \times e^{-\alpha t} + b \times e^{-\beta t} \quad (8)$$

As microconstantes k_{10} (velocidade de eliminação do compartimento central), k_{12} (velocidade de distribuição do compartimento central para o

periférico) e k_{21} (velocidade de redistribuição do compartimento periférico para ao central) foram calculadas após a modelagem dos dados com o uso das equações 9, 10 e 11. A partir das microconstantes, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos (SHARGEL *et al.*, 2004).

$$k_{10} = \frac{\alpha \times \beta}{k_{21}} \quad (9)$$

$$k_{12} = \alpha - \beta - k_{21} - k_{10} \quad (10)$$

$$k_{21} = \frac{(a \times \beta) + (b + \alpha)}{a + b} \quad (11)$$

3.8 Análise Estatística

Todos os dados estão apresentados na forma de média e seus respectivos desvios-padrão. Os parâmetros farmacocinéticos da metadona a partir dos perfis séricos obtidos por abordagem não compartimental foram comparados, grupo a grupo, com os dados obtidos da análise compartimental por teste Wilcoxon Rank-sum ($\alpha = 0,05$). Para comparação de mais de dois grupos, foi utilizado Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Genética

A análise da região do gene *MDR1* onde se encontra a mutação *mdr1-1Δ* indicou que nenhum dos cães Cocker Spaniel Inglês estudados é mutante para o *MDR1*. Na Figura 2, observa-se o gel de poliacrilamida com as amostras dos quatro cães, um controle negativo e os marcadores moleculares.

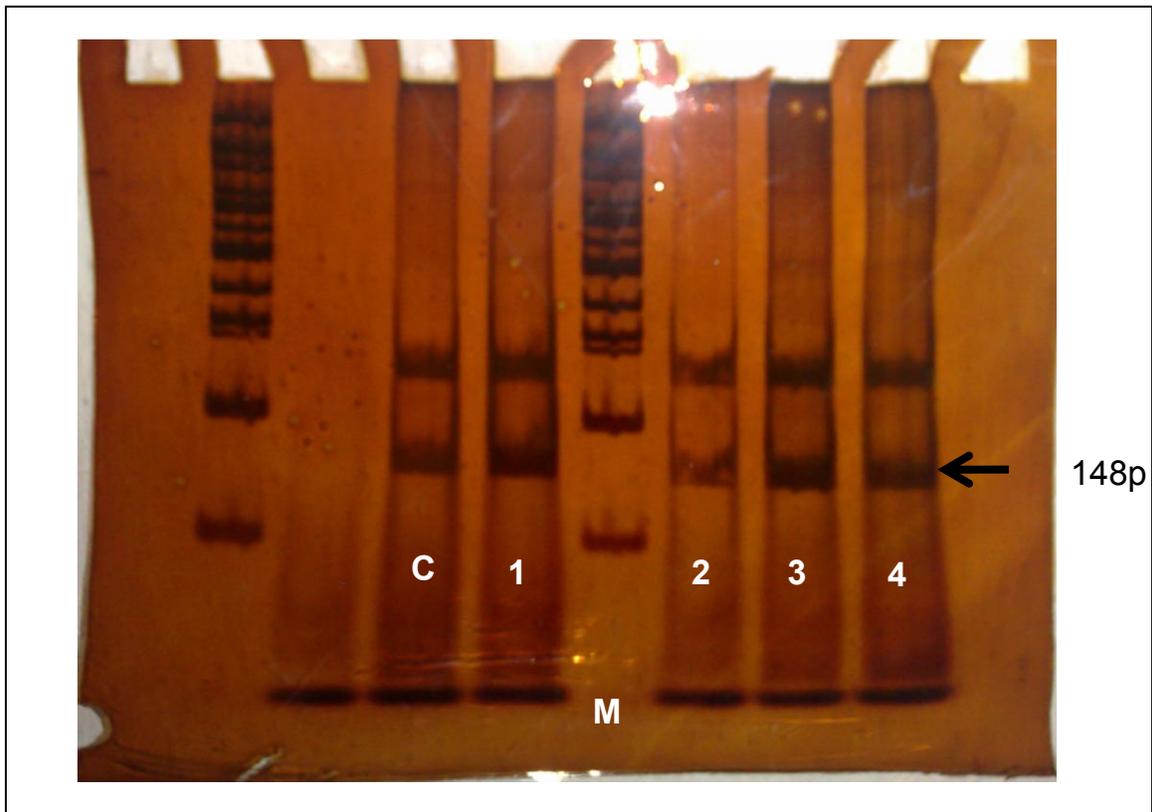


Figura 2. Gel de Poliacrilamida com a corrida dos quatro cães (1, 2, 4 e 5), um controle (3) e os marcadores moleculares (M). A seta indica o lugar onde se encontra o *MDR1* (148 pb). Um cão negativo para a mutação previamente tipificado foi usado como controle (C).

5.2 Validação parcial da metodologia analítica por LC-MS/MS para Quantificação da Metadona em Soro

A validação parcial tem como objetivo garantir que o método previamente publicado seja reproduzido com exatidão, precisão e especificidade, assegurando a credibilidade para seu uso rotineiro (FDA, 2001). No presente trabalho, foi feita a validação parcial com três curvas em um dia, avaliando-se a seletividade, linearidade, exatidão e precisão intradia.

Os cromatogramas obtidos por CLAE da metadona e do fentanil em soro de cães podem ser observados na Figura 3. O tempo de retenção dos fármacos foi de 1,86 e 1,99 min., respectivamente.

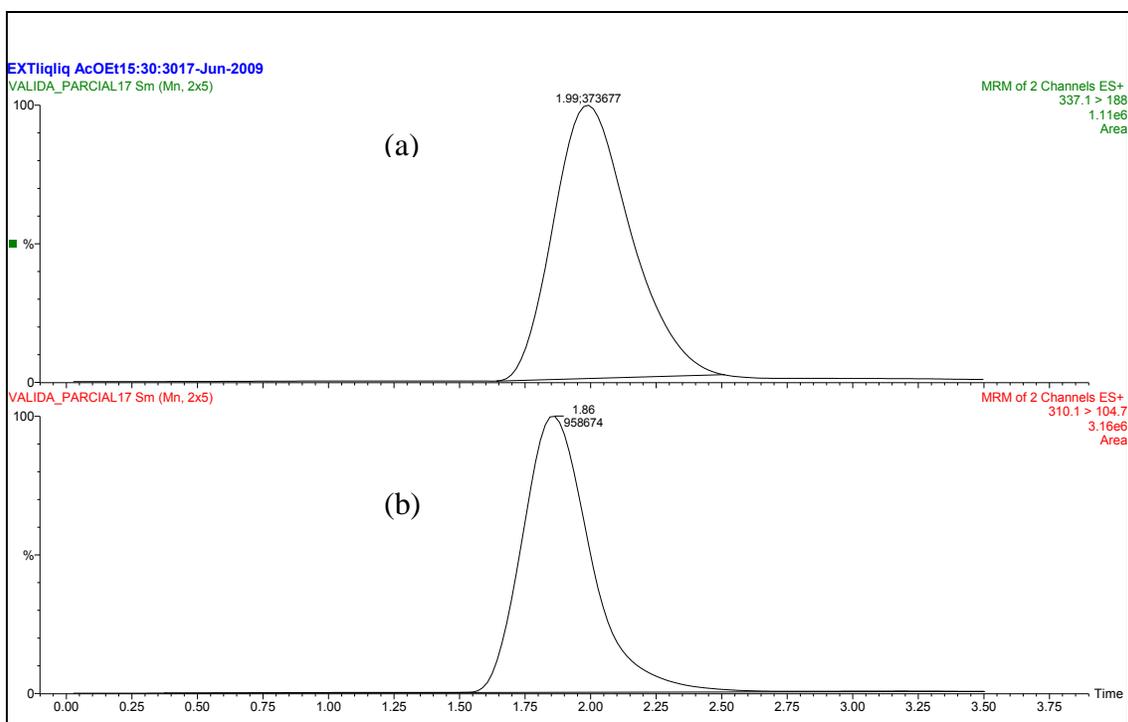


Figura 3. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para metadona e fentanil em soro de cães: a) amostra da curva padrão com 100 ng/mL de fentanil; b) amostra da curva padrão com 100 ng/mL de metadona.

5.2.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é a capacidade de diferenciar e quantificar um analito na presença de outros em uma amostra (FDA, 2001). A seletividade do método pode ser observada na Figura 3, comparando-se os cromatogramas em que não foram observados picos interferentes nas amostras analisadas. O mesmo cromatograma foi observado em amostras obtidas dos animais após administração de metadona por qualquer via estudada.

5.2.2 Precisão

A precisão do método analítico representa a concordância de uma série de medidas resultantes da aplicação repetida do método a amostras homogêneas.

A precisão do método foi avaliada por coeficientes de variação intradia (repetibilidade), determinados em triplicata pela análise de três concentrações (controles de qualidade). Os resultados da precisão podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Desvios padrão relativos intradia das três amostras controle de qualidade utilizadas para a curva padrão de metadona em soro de cães.

Identificação	Concentrações médias/ Variação intra-dia			
	Concentração Nominal	Média	D.P.	D.P.R.
LLOQ	3 ng/mL	3,08	0,25	8,61
QCs	180 ng/mL	190,6	11,8	6,2
	90 ng/mL	98,84	5,1	5,3
	9 ng/mL	8,9	1,1	12,9

D.P.: Desvio Padrão; D.P.R.: Desvio Padrão Relativo; LLOQ: Limite inferior de quantificação. QCs: Controle de qualidade

Os coeficientes de variação intradia devem apresentar valores inferiores a 15% para cada concentração, exceto para o menor limite de quantificação, que deve ser inferior a 20% (FDA, 2001). Os valores encontrados estão de acordo

com o valor anteriormente citado, demonstrando que o método possui repetibilidade.

5.2.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (FDA, 2001). Pelos resultados apresentados na Tabela 5, conclui-se que o método é exato, indicando que as concentrações determinadas estão próximas aos valores teóricos esperados.

Tabela 5. Exatidão para as amostras de controle de qualidade utilizadas para curva padrão da metadona em soro de cães.

Identificação	Concentração		Faixa
	Nominal	Exatidão (%)	Concentração (ng/mL)
LLOQ	3 ng/mL	93,0-108,3	2,79-3,25
	180 ng/mL	100,7-113,3	181,3-203,4
	90 ng/mL	101,4-112,7	91,3-101,4
QCs	9 ng/mL	87,0-112,2	7,8-10,0

LLOQ: Limite inferior de quantificação; QCs: Controle de qualidade

5.2.4 Linearidade

O parâmetro de linearidade é avaliado por meio da verificação de relação linear entre a concentração do analito na amostra e a resposta produzida no detector (FDA, 2001).

A linearidade foi avaliada por meio de cinco pontos, com a faixa de concentração de 3 a 200 ng/mL em soro de cão, obtendo três curvas padrão (Figura 4). O coeficiente de correlação calculado para as curvas padrão da metadona apresentou um valor superior a 0,98, compatível com o valor mínimo de 0,98 estipulado pela FDA (FDA, 2001).

Compound 2 name: metadona Method File: metadona
Coefficient of Determination: 0.989607
Calibration curve: $0.0241828 * x + 0.0299046$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

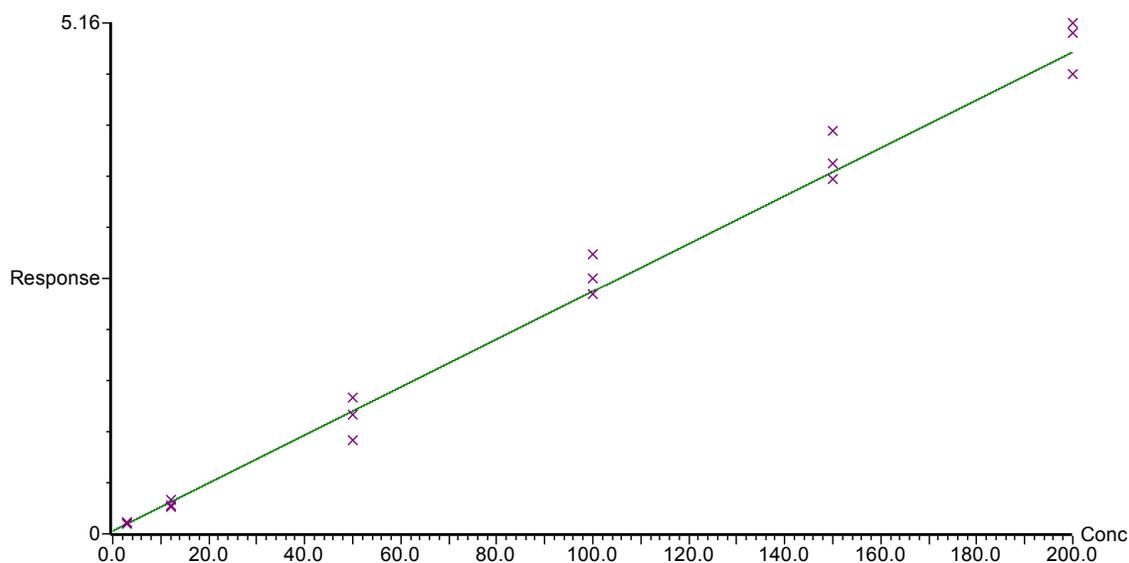


Figura 4. Curva de calibração média para metadona em soro de cães determinada por LC-MS/MS.

5.2.5 Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação da curva padrão é a menor concentração de analito na amostra que pode ser determinada com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120% (FDA, 2001). O método analítico apresentou um limite inferior de quantificação de 3 ng/mL.

5.3 Avaliação Farmacocinética da Metadona

A metadona foi avaliada quanto à sua farmacocinética após administração oral e intravenosa em dose única de 0,5 mg/kg. A escolha das doses foi feita levando-se em consideração os perfis séricos obtidos em estudo piloto.

Após a coleta do grupo intravenoso e análise por LC-MS/MS, foram obtidos os perfis de concentração sérica em relação aos tempos individuais, e esses dados foram analisados por abordagem unicompartmental e bicompartimental.

Os grupos que receberam a metadona em comprimido (sendo um deles associado ao cetoconazol) foram analisados somente pelo método não compartimental. Do mesmo modo, os grupos que receberam a metadona líquida por gavagem ou bucal, foram analisados por abordagem não compartimental. O grupo i.v. foi avaliado pelas duas abordagens.

5.3.1 Avaliação Farmacocinética da Metadona após administração i.v.

A farmacocinética não compartimental baseia-se na aplicação de critérios estatísticos para a análise das curvas séricas, de modo que se obtenham parâmetros representativos das mesmas, sem considerar o conceito de distribuição por compartimentos.

O perfil sérico de metadona obtido após a administração intravenosa na dose de 0,5 mg/kg é apresentado na Figura 5. Os valores de concentração sérica e parâmetros farmacocinéticos individuais determinados encontram-se no Anexo 1.

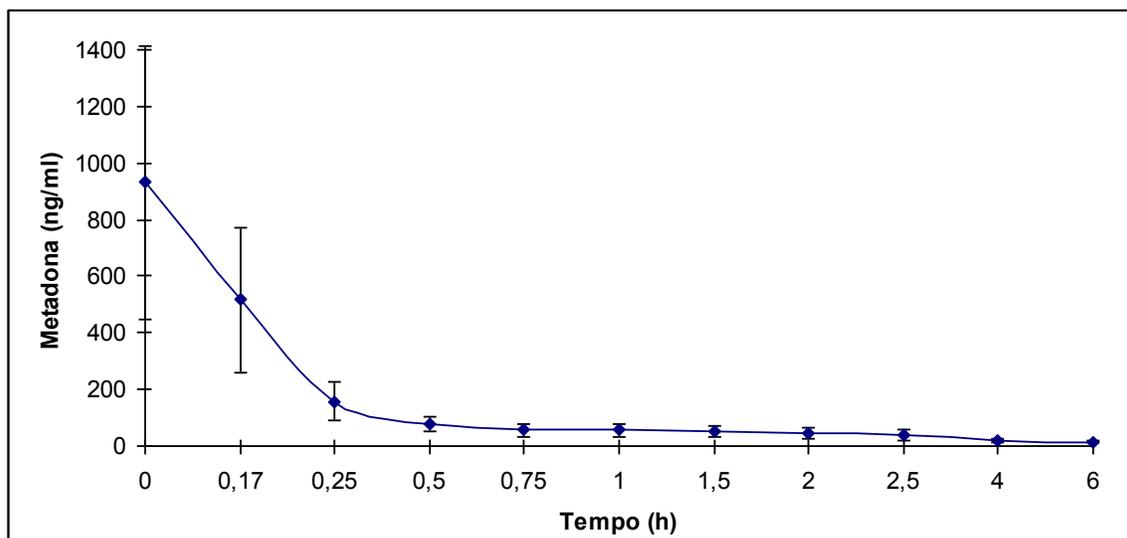


Figura 5. Perfil da concentração sérica média de metadona após administração intravenosa de 0,5 mg/kg a cães Cocker Spaniel (n = 4, média \pm erro padrão).

A Tabela 6 apresenta os parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental .. A constante de eliminação apresentou valor de $0,27 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$, a ASC $0-\infty$ foi $421 \pm 314 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ e o tempo de meia-vida de 3,0 h. A depuração foi de $2,08 \pm 1,72 \text{ L/h/kg}$ e o Vd $7,09 \pm 5,84 \text{ L/kg}$. Tais resultados estão de acordo com o encontrado na literatura (KUKANICH *et al.*, 2005a; KUKANICH *et al.*, 2008). Valores de volume de distribuição entre $3,46 \pm 1,09$ e $9,2 \pm 3,3 \text{ L/kg}$ têm sido relatados para metadona i.v., assim como valores de meia-vida entre $1,53 \pm 0,18$ e $3,9 \pm 1,0$ horas e ASC $0-\infty$ $150,76 \pm 21,92$ e $741 \pm 249,83 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ (KUKANICH *et al.*, 2005a; KUKANICH *et al.*, 2008; INGVAST-LARSSON *et al.*, 2010).

Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona i.v. 0,5 mg/kg (n = 4).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média	D.P.
$\lambda \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,27	0,12
$t_{1/2} \text{ (h)}$	3,0	1,5
ASC _{0-t} (ng·h/mL)	360	286
ASC _{extr} (ng·h/mL)	62	44
ASC $0-\infty$ (ng·h/mL)	421	314
% extrapolado da ASC	16,2	7,2
Cl (L/h/kg)	2,08	1,72
ASMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	1185	891
MRT (h)	3,2	1,4
Vd (L/kg)	7,09	5,84

D.P.: desvio padrão

O perfil sérico da metadona após a administração i.v. apresenta características de dois compartimentos, com inclinação referente à fase de distribuição e outra referente à fase de eliminação.

Nos modelos farmacocinéticos compartimentais, o organismo é representado como um sistema de compartimentos ligados entre si. Um compartimento não representa necessariamente uma região fisiológica ou anatômica; é considerado como um tecido ou grupo de tecidos que possuem similaridade de fluxo sanguíneo e de afinidade pelo fármaco. A utilização de

modelos compartimentais permite definir quantitativamente os processos cinéticos de fármacos no organismo com a utilização de equações representativas (SHARGEL & YU, 2005).

A análise compartimental dos perfis individuais da metadona obtidos após administração i.v. com utilização do modelo de dois compartimentos (equação 8) proporcionou o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, cuja média pode ser observada na Tabela 7. O perfil médio modelado encontra-se na Figura 6.

A análise estatística comparando os parâmetros farmacocinéticos determinados pelas abordagens não compartimental e compartimental confirmou a adequação do modelo escolhido aos dados experimentais, uma vez que não houve diferenças significativas entre $ASC_{0-\infty}$, V_d , Cl e tempo de meia-vida (Tabela 8). Os valores obtidos de MSC (2,40 a 4,1) corroboram a escolha do modelo.

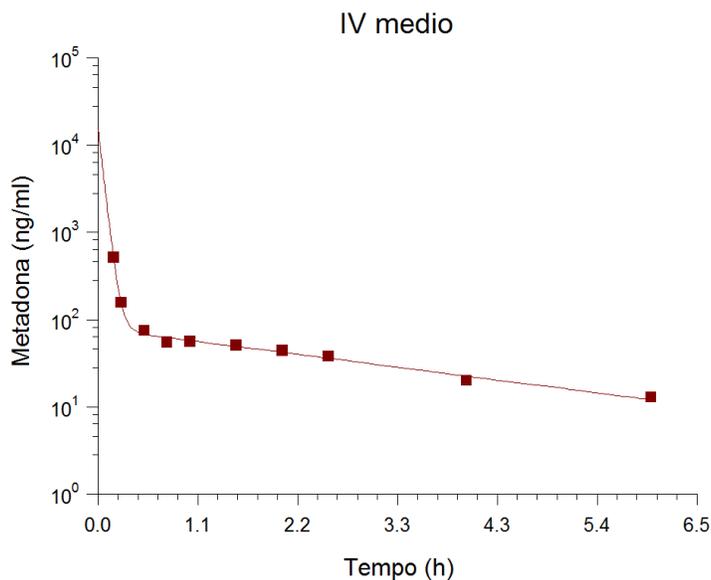


Figura 6. Perfil modelado de concentração sérica média de metadona após administração intravenosa de 0,5 mg/kg em cães Cocker Spaniel (n = 4, média).

Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos médios empregando modelo de dois compartimentos aos dados séricos de metadona i.v. na dose de 0,5 mg/kg (n = 4).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média	D.P.
a (ng/mL)	25583,50	41769,60
b (ng/mL)	76,52	65,59
α (h^{-1})	21,63	6,03
β (h^{-1})	0,28	0,05
k_{21} (h^{-1})	0,54	0,17
k_{10} (h^{-1})	12,79	7,54
k_{12} (h^{-1})	934,31	617,66
ASC_{∞} (ng·h/mL)	1282,83	1684,14
Vc (L/kg)	0,17	0,17
Cl (L/kg/h)	1,34	1,20
Vd _{SS} (L/kg)	3,34	3,63
Vd _{area} (L/kg)	5,46	5,22
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,03	0,01
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,52	0,44
MSC (h)	3,34	0,71

D.P.: desvio padrão

Tabela 8. Comparação dos parâmetros determinados por abordagem compartimental e não compartimental dos perfis plasmáticos de metadona i.v. na dose de 0,5 mg/kg (n = 4).

Parâmetros	Não-compartimental (média ± desvio padrão)	Compartimental (média ± desvio padrão)
λ ou β (h^{-1})	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,05
$t_{1/2}$ (h)	1,70 ± 0,39	1,52 ± 0,34
ASC (ng·h/mL)	420 ± 313	1282 ± 1684
CL (L/h/Kg)	2,08 ± 1,72	1,34 ± 1,20
Vd (L/Kg)	7,09 ± 5,83	3,34 ± 3,76
MSC	--	2,40 - 4,1

5.3.2 Análise farmacocinética da metadona em comprimido via oral

A metadona em comprimido foi avaliada quanto à sua farmacocinética após administração oral em dose única de 0,5 mg/kg, sendo que, em um dos

dois grupos, foi administrada posteriormente, com duas doses de cetoconazol 10 mg/kg com 12,5 e 0,5 horas de antecedência. Tais experimentos visaram a estabelecer a comparação entre a biodisponibilidade da metadona isolada e associada a um inibidor enzimático e de bomba de efluxo GpP.

No Anexo 2, há uma tabela com as concentrações séricas detectadas em cada cão.

O perfil sérico da metadona obtido após a administração do comprimido associado ao cetoconazol é apresentado na Figura 6. Os perfis individuais permitiram a determinação dos parâmetros farmacocinéticos médios por abordagem não compartimental apresentados na Tabela 9.

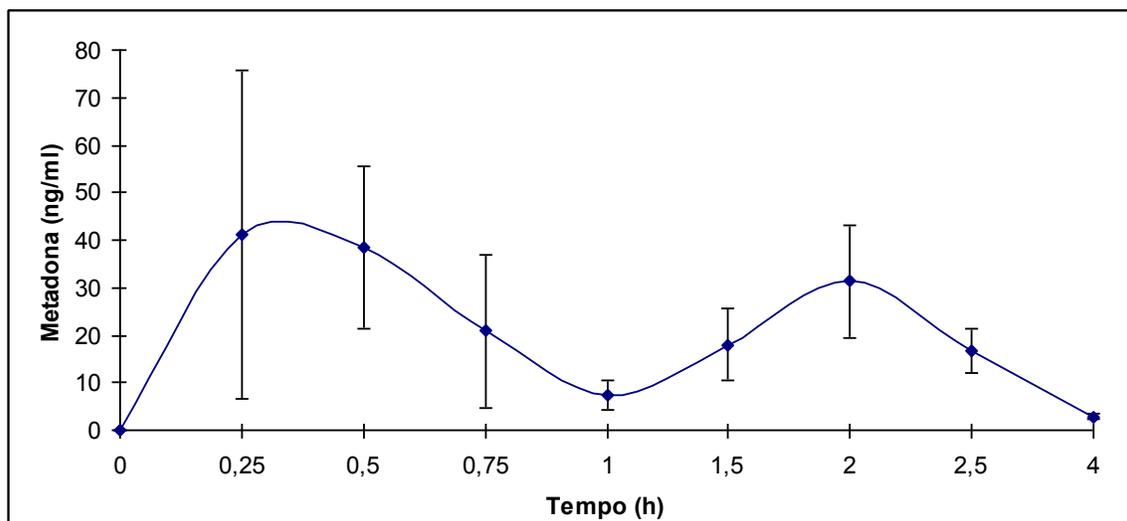


Figura 7. Perfil da concentração sérica média de metadona após administração da dose de 0,5 mg/kg associada a cetoconazol (10 mg/kg p.o. c/12h, 2 doses) em cães Cocker Spaniel Inglês (n = 4, média \pm erro padrão).

A administração da metadona em comprimido isolada v.o. na dose de 0,5 mg/kg não possibilitou a quantificação em nenhum tempo, o que está de acordo com os resultados de KUKANICH e colaboradores (2005a).

No grupo que recebeu a metadona em comprimido associada a comprimido de cetoconazol, foram detectadas concentrações desde os 15 minutos até as 4 horas em todas as unidades experimentais; depois desse período, os níveis não foram mais detectáveis.

Neste último grupo, a constante de eliminação apresentou um valor de $1,13 \pm 0,24 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de meia-vida $0,64 \pm 0,15 \text{ h}$. A depuração foi de $1,16 \pm 0,06 \text{ L/kg/h}$ e o volume de distribuição $2,22 \pm 0,08 \text{ L/kg}$. Todos os parâmetros da metadona oral com cetoconazol foram significativamente superiores ao grupo da metadona isolada. Não foram encontrados na literatura pesquisada dados sobre os parâmetros farmacocinéticos de metadona oral em cães.

Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona v.o. co-administrada associada a 10 mg/kg de cetoconazol v.o. (c/12h 2 doses) (n = 4).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média	D.P.
$\lambda \text{ (h}^{-1}\text{)}$	1,13	0,24
$t_{1/2} \text{ (h)}$	0,64	0,15
$ASC_{0-t} \text{ (ng}\cdot\text{h/mL)}$	71	4
$ASC_{extr} \text{ (ng}\cdot\text{h/mL)}$	2	0,9
$ASC_{0-\infty} \text{ (ng}\cdot\text{h/mL)}$	73	4
% extrapolado da ASC	3,3	1,2
CI (L/h/kg)	1,16	0,06
$ASMC_{0-\infty} \text{ (ng}\cdot\text{h}^2\text{/mL)}$	139	49
MRT (h)	1,90	0,71
Vd (L/kg)	2,22	0,88
Biodisponibilidade (%)	18	

D.P.: desvio padrão

5.3.3 Análise farmacocinética da metadona líquida bucal e esofágica

A metadona líquida foi avaliada quanto à sua farmacocinética após administração bucal e esofágica em dose única de 0,5 mg/kg. A escolha da dose foi feita considerando-se estudos-piloto. Tais experimentos visaram a estabelecer uma comparação da velocidade e extensão da absorção da

metadona, no intuito de procurar uma opção para a administração oral do fármaco em cães.

A tabela com as concentrações séricas de cada unidade experimental e parâmetros farmacocinéticos calculados no modelo não compartimental encontra-se nos anexos 4 e 5.

O perfil plasmático médio da metadona após administração bucal em dose de 0,5 mg/kg é apresentado na Figura 8. Os perfis individuais permitiram a determinação dos parâmetros farmacocinéticos por abordagem não compartimental que são apresentados na Tabela 10.

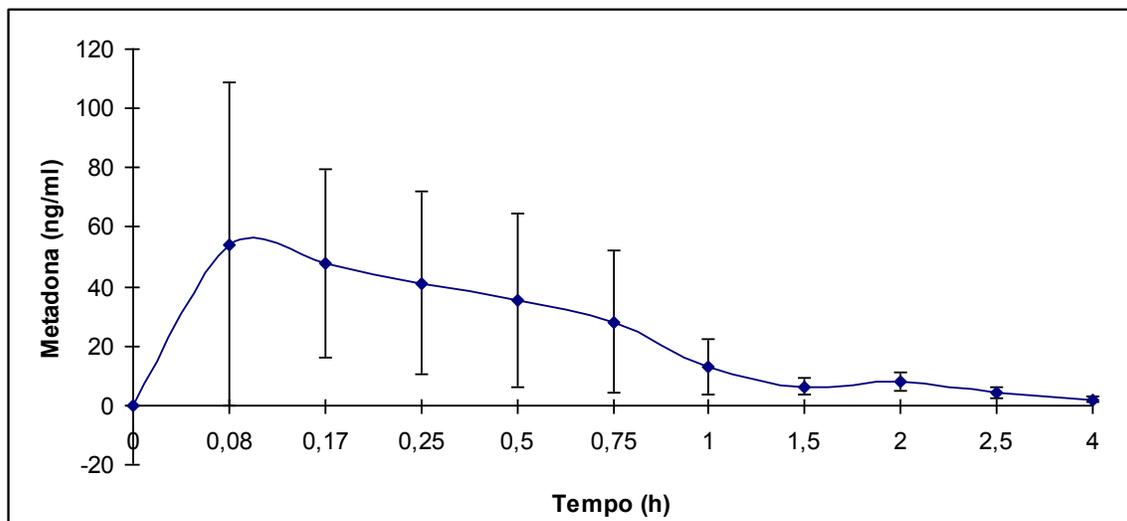


Figura 8. Perfil de concentração sérica média de metadona líquida após administração da dose de 0,5 mg/kg bucal a cães Cocker Spaniel Inglês (n=3, média \pm erro padrão).

A metadona foi administrada na região bucal na dose de 0,5 mg/kg no volume de 0,6 mL, sem restrição de engolir ou movimentar a língua após o manejo. Antes da administração do fármaco, o pH da cavidade oral foi determinado usando-se indicadores de fita. Três cães apresentaram pH 8, e um deles, 9. Após as 4 horas de administração do fármaco, não foram detectadas concentrações séricas acima do limite inferior de quantificação, sendo que um

dos cães não apresentou concentrações detectáveis em nenhuma das coletas. Nenhum animal apresentou concentrações detectáveis no tempo 0.

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona bucal (n = 3).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média	D.P.
λ (h^{-1})	0,49	0,23
$t_{1/2}$ (h)	1,70	0,92
ASC _{0-t} (ng·h/mL)	55	56
ASC _{extr} (ng·h/mL)	5	3
ASC 0- ∞ (ng·h/mL)	60	58
% extrapolado da ASC	14,9	17,2
Cl (L/h/kg)	2,45	2,24
ASMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	88	55
MRT (h)	2,01	0,96
Vd (L/kg)	6,3	7,7
Biodisponibilidade (%)	15	

D.P.: desvio padrão

A constante de eliminação mostrou valor de $0,49 \pm 0,23 h^{-1}$ e o tempo de meia-vida $1,7 \pm 0,92 h$. O *clearance* foi de $2,45 \pm 2,24 L/h/kg$, e o Vd $6,33 \pm 7,67 L/kg$. A biodisponibilidade foi determinada em 0,15.

No grupo que recebeu a formulação líquida no esôfago, a detecção de níveis de metadona no soro foi possível até os 150 minutos, já que depois deste momento não houve concentrações detectáveis em soro pela nossa metodologia. Um dos cães não apresentou concentrações detectáveis em nenhum dos momentos.

Tabelas com as concentrações séricas e parâmetros farmacocinéticos de cada unidade experimental encontram-se no Anexo 4.

A Figura 11 ilustra o perfil sérico obtido após a administração da metadona líquida por gavagem na dose de 0,5 mg/kg. Parâmetros farmacocinéticos foram calculados por abordagem não compartimental a partir dos perfis individuais, que podem ser observados na Tabela 8.

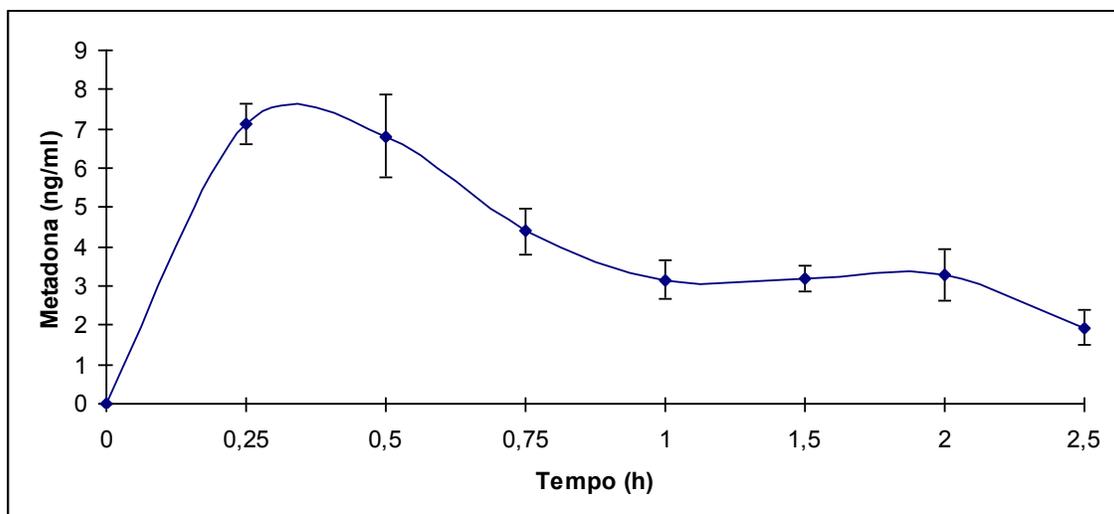


Figura 9. Perfil médio de concentração sérica de metadona líquida após administração da dose de 0,5 mg/kg esofágica a cães Cocker Spaniel Inglês (n=3, média \pm erro padrão).

Tabela 11. Parâmetros farmacocinéticos médios obtidos por abordagem não compartimental a partir dos dados plasmáticos resultantes da administração de 0,5 mg/kg de metadona esofágica (n = 3).

Parâmetros Farmacocinéticos	Média	D.P.
λ (h^{-1})	0,76	0,31
$t_{1/2}$ (h)	1,06	0,57
ASC _{0-t} (ng·h/mL)	10	1
ASC _{extr} (ng·h/mL)	3	1
ASC 0- ∞ (ng.h/mL)	12	2
% extrapolado da ASC	23	8
Cl (L/h/kg)	1,24	0,23
ASMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	23	8
MRT (h)	1,78	0,39
% extrapolado da ASC	2,2	0,3
Biodisponibilidade (%)	3	

D.P.: desvio padrão

A comparação estatística entre os parâmetros farmacocinéticos calculados por análise não compartimental para o grupo bucal e esofágico não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Já quando comparados, os

dois grupos da metadona líquida com o grupo comprimido isolado, foi observada diferença estatisticamente significativa em todos os dados farmacocinéticos (tabela 12).

Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos dos grupos em diferentes formulações: v.o comprimido; v.o. com cetoconazol, v.o. solução (esofágico e bucal). * diferença significativa do grupo que recebeu metadona comprimido.

Parâmetros Farmacocinéticos	v.o. comp.	v.o. + cetoconazol	v.o. sol. gavagem	v.o. sol. bucal
λ (h^{-1})	0	1,1*	0,8*	0,5*
$t_{1/2}$ (h)	0	0,6*	1,1*	1,7*
ASC _{0-∞} (ng*h/mL)	0	73,7*	12,4*	59,7*
Cl (L/h/kg)	0	1,2*	1,2*	2,4*
Biodisponibilidade	0	18%*	3%*	15%*

6 DISCUSSÃO

A metadona é transportada pela GpP e biotransformada pelo sistema CYP intestinal, atribuindo-se a esses fatores a grande variabilidade na biodisponibilidade desse fármaco quando administrado por via oral (BOUER *et al.*, 1999; EAP *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2005; CRETOL *et al.*, 2007). Lown *et al.* (1997) concluíram que as diferentes expressões da GpP interferem na absorção dos substratos da bomba de efluxo, levando-se em conta a grande variação observada na biodisponibilidade em humanos que receberam ciclosporina v.o.

No cão, a variação de expressão de GpP não é descrita, podendo ser uma hipótese para explicar a ampla variabilidade nas concentrações séricas de metadona no presente estudo. Outro fator a ser considerado poderia ser a presença de metabolizadores rápidos, intermediários e lentos, porém não foi objetivo desta pesquisa tal avaliação.

A biodisponibilidade da metadona isolada foi 0%, no entanto, quando associada a antifúngico foi significativamente superior, apresentando um valor de 18%. A metadona em comprimido tem dissolução no estômago, mas o pH ácido desse meio favorece sua ionização e desfavorece sua absorção, e, ao chegar ao intestino, entra em contato com um meio menos ácido, o que propicia a passagem pela barreira intestinal (WEINBERG, 1988). A metadona administrada em humanos com inibidores da GpP produz concentrações séricas significativamente maiores quando comparada com a metadona oral isolada (KHARASCH *et al.*, 2004). Em Beagles que receberam metadona em comprimido (2 mg/kg) associada a duas administrações de cetoconazol (10 mg/kg 12,5 e 0,5 h antes da metadona), metadona foi detectada em 1 dentre 6 cães, mas não fica claro se a biodisponibilidade nos outros cães foi afetada já que o limite de detecção por HPLC foi de 20 ng/mL (KUKANICH, 2005a).

Além dos seus efeitos antifúngicos, o cetoconazol é um inibidor da citocromo P450 3A12 (CYP3A12) em cães (LU *et al.*, 2005). Modelos *in vitro* também têm identificado o cetoconazol como um inibidor da bomba de efluxo GpP em células caninas (TAUB *et al.*, 2005; FAN & RODRIGUEZ-PROTEAU,

2008). Hugnet *et al.* (2007) examinaram os efeitos do cetoconazol na farmacocinética da ivermectina oral em cães, aumentando tanto o MRT como a depuração, mas não ficando claro se a diminuição da eliminação da ivermectina é devido à inibição do sistema CYP ou da bomba de efluxo GpP.

Os dados sugerem que os sistemas enzimáticos do enterócito e/ou a GpP em nível intestinal tiveram menor ação sobre a metadona quando associada ao cetoconazol, fazendo-se detectável no soro.

No grupo em que foram detectados níveis de metadona, todos os animais mostram um duplo pico no perfil farmacocinético, separado por um intervalo de 90 minutos. O fenômeno de duplo pico tem sido descrito em vários fármacos administrados v.o. como a cimetidina, furosemida, piroxicam, ranitidina, talinolol, alprazolam e fenazopiridina (OBERLE & AMIDON, 1987; LANGGUTH *et al.*, 1994; POLLI *et al.*, 1996; PLUSQUELLEC *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; MOSTAFAVI & FOSTER, 2003; YIN *et al.*, 2003).

Sabe-se que diferentes padrões de esvaziamento gástrico e motilidade intestinal afetam a concentração plasmática de cimetidina, podendo provocar duplos picos (OBERLE & AMIDON, 1987). A metadona é um fármaco que também afeta a motilidade gastrointestinal, podendo ser uma explicação para o duplo pico observado nos animais. Langguth *et al.* (1994) estudaram, em cães, a influência do esvaziamento gástrico e do complexo motor migratório interdigestivo na absorção de cimetidina administrada em comprimido (p.o.), concluindo que o esvaziamento gástrico influencia o aparecimento de um duplo pico, no entanto, esse é somente um de vários outros fatores implicados.

Polli *et al.* (1996) verificaram que o estímulo de ingestão de comida estimula o esvaziamento da vesícula biliar, o que produz um duplo pico de piroxicam em pacientes humanos.

Sabe-se que a metadona tem circulação entero-hepática em outras espécies, mas não foi estudada em cães (TURNBOU *et al.*, 1976). Os cães deste estudo apresentam o segundo pico aos 120 minutos, momento em que foi oferecida ração, o que poderia ter provocado o esvaziamento da vesícula biliar, aumentando momentaneamente a chegada de bile com metadona ao intestino e

provocando o segundo pico de concentração sérica. Outra possível explicação para o fenômeno de duplo pico é uma absorção descontínua ao longo do intestino, ou seja, um segmento intestinal de absorção relativamente baixa entre dois sítios sucessivos altamente absorptivos (Plusquellec *et al.*, 1999). Elaborar análises absorptivas poderia ser necessário para o melhor entendimento dos mecanismos que estão envolvidos neste perfil atípico de concentração-tempo (ZHOU, 2003).

Na literatura, não temos encontrado dados farmacocinéticos da metadona solução em cães. Em eqüinos, a metadona foi administrada via oral em preparação com xarope de milho, obtendo, na dose de 0,4 mg/kg, uma meia-vida de 1,5, o que está de acordo com nossos dados. Nesse trabalho, os pesquisadores determinaram o Tmax em $30 \pm 8,6$ min, um tempo maior que o caso do presente estudo, provavelmente devido ao maior tempo em que o fármaco misturado em xarope permaneceu em contato com a mucosa oral (LINARDI *et al.*, 2009).

O perfil bucal mostrou que a Tmax foi alcançada em 5 minutos, com fase de distribuição e eliminação similar ao grupo intravenoso. Conforme descrito para outras espécies, verificou-se variabilidade individual entre os cães para os parâmetros farmacocinéticos estimados (EAP *et al.*, 2002; KUKANICH *et al.*, 2005a; LINARDI *et al.*, 2009).

Por se saber que uma das grandes vantagens da absorção na cavidade oral é prevenir o metabolismo de primeira passagem e que o pH básico da cavidade oral favorece a absorção de fármacos alcalinos, assume-se que pelo menos parte da metadona foi absorvida na cavidade oral antes de alcançar a mucosa esofágica ou intestinal devido à grande quantidade de vasos sangüíneos locais (SHARGEL *et al.*, 2005).

Os parâmetros farmacocinéticos em cães, por essa via, foi caracterizado por uma meia-vida curta, alto *clearance* e pequeno volume de distribuição, o que indica uma eliminação rápida da droga.

Estes dados suportam a hipótese de que a metadona é absorvida na forma líquida após a administração bucal, e alcança concentrações em cães

com níveis terapêuticos reportados a dados obtidos em humanos e outras espécies. No entanto, não foi possível determinar se a absorção foi na cavidade oral ou nos setores seguintes ao trato gastrointestinal, como a mucosa esofágica, o que conduziu à execução de um último grupo.

No último grupo, foi administrada metadona na mesma dose e volume por gavagem, e também foram detectadas concentrações em soro, sugerindo que o fármaco foi absorvido na mucosa esofágica. Estes dados revelam que tanto a via bucal como a esofágica foram efetivas na absorção. No entanto, pela via esofágica a concentração média mais alta foi aos 30 minutos e com uma concentração máxima menor que a bucal. Um dos cães não apresentou concentrações, resultando em uma amostra experimental escassa para comparar estes dois grupos, mas suficiente para comprovar que a absorção do fármaco ocorre, e que, pela via bucal, a droga atinge o compartimento central em 5 minutos, sugerindo ser uma possível via para administração de metadona para episódios de dor aguda. Mais estudos com uma amostragem maior são necessários para determinar com maior precisão a farmacocinética da metadona líquida pela via bucal.

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste experimento, é possível concluir que:

- a metodologia analítica usada por LC MS-MS para a determinação de metadona em soro de cão é adequada para quantificação do analito.
- A metadona em comprimido não apresenta níveis séricos em cães, ao contrário da apresentação líquida, tanto na administração esofágica como oral.
- Há diferença entre a administração isolada de metadona comprimido e aquela administrada com cetoconazol para todos os parâmetros farmacocinético calculados.
- Em relação às outras variáveis analisadas, é possível inferir que a metadona v.o. em solução produz níveis séricos maiores de metadona que a esofágica e em tempo menor.

8 REFERÊNCIAS

ARAGÓN-POCE F.; MARTÍNES FERNÁNDEZ E.; MÁRQUEZ-ESPINÓS C.; PÉREZ A.; MORA R.; TORRES L.M. History of Opium. International Congress Series v. 1242: 19-21, 2002.

BELLAMY W.T. P-Glycoproteins and multidrug resistance. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 36:161- 183, 1996.

BELLWARD G.D., WARREN P.M., HOWALD W., AXELSON J.E., ABBOTT F.S. Methadone maintenance: effect of urinary pH on renal clearance in chronic high and low doses. Clinical Pharmacology and Therapeutics, v. 22 (1):92- 99, 1977.

BLANCQUAERT J.P., LEFEBVRE R.A., WILLEMS J.L. Emetic and antiemetic effects of opioids in the dog. European Journal of Pharmacology, v. 128:143-150, 1986.

BOUËR R., BARTHE L., PHILIBERT C., TOURNAIRE C., WOODLEY J., HOUIN G. The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. Fundamental and Clinical Pharmacology, v. 13:494- 500, 1999.

BRUERA E., SWEENEY C. Methadone Use in cancer patients with pain: a Review. Journal of Palliative Medicine, v. 5 (1):127-138, 2002.

CHAN L.M., LOWES S., HIRST B.H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 21(1):25-51, 2004.

CODD E.E., SHANK R.P., SCHUPSKY J.J., RAFFA B.B. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural

determinants and role in antinociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 274:1263- 1270, 1995.

CRETOL S., MONNAT M., EAP C.B. Could pharmacogenetic data explain part of the interindividual sensitivity to methadone-induced respiratory depression?. *Critical Care*, v. 11(1): 119- 120, 2007.

DALE O., HOFFER C., SHEFFELS P., KHARASCH E.D. Disposition of nasal, intravenous, and oral methadone in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 72(5): 536- 545, 2002.

DALE O., SHEFFELS P., KHARASCH E.D. Bioavailabilities of rectal and oral methadone in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 58(2): 156- 162, 2004.

DESMEULES J.A., PIGUET V., EHRET G.B., DAYER P. Pharmacogenetics, Pharmacokinetics and Analgesia. *The Genetics of Pain, Progress in Pain Research and Management*, v.28: 211- 237, 2004.

DHAWAN B.N.; CESSÉLIN F.; RAGHUBIR R.; REISINE T.; BRADLEY P.B.; PORTOGHESE P.S; HAMON M. Classification of opioid receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 48(4):567-592, 1996.

DIAZ DEL CONSUELO I., FALSON F., GUY R.H., JACQUES Y. Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl. *Journal of Controlled Release*, v. 122:135- 140, 2007.

DIETRICH C.G., GEIER A., OUDE ELFERINK R.P. ABCA of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, v. 52(12):1788- 1795, 2003.

EAP CH.B., BUCLIN T., BAUMANN P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: Implications for the treatment of opioid dependence. *Clinical Pharmacokinetics* v. 41(14):1153- 1193, 2002.

EICHELBAUM M., INGELMAN-SUNDBERG M., EVANS W.E. Pharmacogenomics and Individualized drug therapy. *Annual Review of Medicine*, v. 57:119- 137, 2006.

FAN Y., RODRIGUEZ-PROTEAU R. Ketoconazole and the modulation of multidrug resistance-mediated transport in Caco-2 and MDCKII-MDR1 drug transport models. *Xenobiotica*, v. 38:107- 129, 2008.

FDA. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Acesso em 7 de fev. de 2010.

FECHT S., WÖHLKE A., HAMANN H., DISTL O. Analysis of the canine mdr1-1Δ mutation in the dog breed Elo. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 54:401- 405, 2007.

GEYER J., DÖRING B., GODOY J.R., LEIDOLF R., MORITZ A., PETZINGER E. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 28:545- 551, 2005a.

GEYER J., DÖRING B., GODOY J.R., MORITZ A., PETZINGER E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 28:95- 99, 2005b.

GEYER J., KLINTZSCH S., MEERKAMP K., WÖHLKE A., DISTL O. MORITZ A., PETZINGER E. Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 30:482- 485, 2007.

GIBALDI M., PERRIER D. *Pharmacokinetics*. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1982.

GORMAN A.L., ELLIOT K.J., INTURRISI C.E. The d- and l-isomers of methadone bind to the non-competitive site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in rat forebrain and spinal cord. *Neuroscience Letters*, v. 223:5- 8, 1997.

GOURLAY G.K., CHERRY D.A., COUSINS M.J. A comparative study of the efficacy and pharmacokinetics of oral methadone and morphine in the treatment of severe pain in patients with cancer. *Pain*, v. 25:297- 312, 1986a.

GOURLAY G.K., WILLIS R.J., LAMBERTY J. A double-blind comparison of the efficacy of methadone and morphine in postoperative pain control. *Anesthesiology*, v. 64:322- 327, 1986b.

GUTSTEIN H.B. & AKIL H. In: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica*. 11^a ed., Colombia: Mc-Graw-Hill Interamericana, p 457- 589, 2007.

HAGEN N.A., KISHER K., STILES C. Sublingual methadone for the management of cancer-related breakthrough pain: a pilot study. *Journal of Palliative Medicine*, v. 10(2): 331- 337, 2007.

HOCHSTEIN P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: mechanisms of drug-induced hemolysis. *Experimental Eye Research*, v. 11(3):389- 395, 1971.

HUGNET C., BENTJEN S.A., MEALEY K.L. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 27: 227- 229, 2004.

HUGNET C., LESPINE A., ALVINERIE M. Multiple oral dosing of ketoconazole increases dog exposure to ivermectin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 10:311- 318, 2007.

IEIRI I., TAKANE H., OTSUBO K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 43(9):553- 576, 2004.

INGVAST-LARSSON C., HOLGERSSON A., BONDESSON U., LAGERSTEDT A-S., OLSSON K. Clinical pharmacology of methadone in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 37:48-56, 2010.

INTURRISI C.E., VEREBELY K. The levels of methadone in the plasma in methadone maintenance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 13:633- 637, 1972.

KHARASCH E.D., HOFFER C., WHITTINGTON D., SHEFFELS P. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 74(6): 543- 554, 2003.

KHARASCH E.D., HOFFER C., WHITTINGTON D. The effect of quinidine, used as a probe for the involvement of P-glycoprotein, on the intestinal absorption and pharmacodynamics of methadone. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 57(5):600- 610, 2004.

KRISTENSEN K., BLEMMER T., ANGELO H.R., CHRISTRUP L.L., DRENCK N.E., RASMUSSEN S.N., SJOGREN P. Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 18:221- 227, 1996.

KREEK M.J. BENCSATH F.A., FIELD F.H. Effects of liver disease on urinary excretion of methadone and metabolites in maintenance patients: quantitation by direct probe chemical ionization mass spectrometry. *Biomedical Mass Spectrometry*, v. 7:385- 395, 1980.

KUKANICH B., LASCELLES B.D., AMAN A.M. MEALEY K.L. PAPICH M.G. The effects of inhibiting cytochrome P450 3A, p-glycoprotein, and gastric acid secretion on the oral bioavailability of methadone in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 28:461- 466, 2005a.

KUKANICH B., LASCELLES B.D., PAPICH M.G. Validation of a High-Pressure Liquid Chromatography and Fluorescence Polarization Immunoassay for the determination of methadone in canine plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 27(3):389- 392, 2005b.

KUKANICH B., BORUM S.L. The disposition and behavioral effects of methadone in Greyhounds. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 35(3):242- 248, 2008.

KUROHA M., KUZE Y., SHIMODA M., KOKUE E. In vitro characterization of the inhibitory effects of ketoconazole on metabolic activities of cytochrome P-450 in canine hepatic microsomes. *American Journal of Veterinary Research*, v. 63:900- 905, 2002a.

KUROHA M., AZUMANO A., KUZE Y., SHIMODA M., KOKUE E. Effect of multiple dosing of ketoconazole on pharmacokinetics of midazolam, a

cytochrome P-450 3A substrate in beagle dogs. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 30:63-68, 2002b.

LAMONT L.A.; MATHEWS K.A. In: Lumb & Jones. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4a ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing, p 241- 271, 2007.

LANGGUTH P., LEE K.M., SPAHNLANGGUTH H., AMIDON G.L. Variable gastric-emptying and discontinuities in drug absorption profiles-dependence of rates and extent of cimetidine absorption on motility phase and pH. *Biopharmaceutics and drug disposition*, v. 15:719- 746, 1994.

LI Y., KANTELIP J-P., SCHIEVEEN P.G., DAVANI S. Interindividual variability of methadone response, Impact of genetic polymorphism. *Molecular Diagnosis and Therapy*, v.12(2):109- 124, 2008.

LINARDI R.L. & NATALINI C.C. Multi-Drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciência Rural*, v. 36(1):336- 341, 2006.

LINARDI R.L., STOKES A.M., BARKER S.A., SHORT C., HOSGOOD G., NATALINI C.C. Pharmacokinetics of the injectable formulation of methadone hydrochloride administered orally in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 32:492- 407, 2009.

LITTLE A.A., KROTSCHKECK U., BOOTHE D.M., ERB H.N. Pharmacokinetics of buccal mucosal administration of fentanyl in a carboxymethylcellulose gel compared with IV administration in dogs. *Veterinary Therapeutics*, v. 9(3): 201- 211, 2008.

LIVINGSTON A., CHAMBERS P. The Physiology of pain. In: Pain Management in Animals, Flecknell P.A. & Waterman-Pearson A. 1st ed., London: WB Saunders, p. 21-52, 2000.

LOWN K.S., MAYO R.R., LEICHTMAN A.B., HSIAO H.L., TURGEON D.K., SCHMIEDLIN-REN P., BROWN M.B., GUO W., ROSSI S.J. BENET L.Z., WATKINS P.B. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 62:248- 260, 1997.

LU P., SINGH S.B., CARR B.A., FANG Y., XIANG C.D., RUSHMORE T.H., RODRIGUES A.D., SHOU M. Selective inhibition of dog hepatic CYP2B11 and CYP3A12. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 313:518-28, 2005.

MAIANTE A.A., TEIXEIRA NETO F.J., BEIER S.L., CORRENTE J.E., PEDROSO C.E.B.P. Comparison of the cardio-respiratory effects of methadone and morphine in conscious dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 32(4):317-328, 2008.

MEALEY K.L., BENTJEN S.A., GAY J.M., CANTOR G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. *Pharmacogenetics* v. 11:727- 733, 2001.

MEALEY K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* v. 27:257- 264, 2004.

MEALEY K.L. Pharmacogenetics. In: *Veterinary Clinics, Small Animal Practice*. USA: Elsevier Saunders, v. 36:961- 973, 2006.

METZGER I.F., SOUZA-COSTA D.C., TANUS-SANTOS J.E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. Medicina (Ribeirão Preto), v.39(4):515-521, out/dez 2006.

MONTEIRO E.R., FIGUEROA C.D.N., CHOMA J.C., CAMPAGNOL D., BETTINI C.M. Effects of methadone, alone or in combination with acepromazine or xylazine, on sedation and physiologic values in dogs. Veterinary Anaesthesia and Analgesia v. 35:519- 527, 2008.

MONTEIRO E.R., RODRIGUEZ A.Jr., QUIRILOS H.M.A., CAMPAGNOL D., GOMES J.Q. Comparative study on the sedative effects of morpinhe, methadone, butorphanol or tramadol, in combination with acepromazine, in dogs. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, v. 36: 25- 36, 2009.

MORLEY J.S., BRIDSON J., NASH T.P., MILES J.B., WHITE S., MAKIN M.K. Low-dose methadone has an analgesic effect in neuropathic pain: a double-blind randomized controlled crossover trial. Palliative Medicine, v. 17: 576- 587, 2003.

MOSTAFAVI S.A., FOSTER R.T. Influence of cimetidine co-administration on the pharmacokinetics of acebutolol enantiomers and its metabolite diacetolol in a rat model: the effect of gastric pH on double-peak phenomena. International Journal of Pharmaceutics, v. 255:81- 86, 2003.

MUSSHOFF F., TRAFKOWSKI J., KUEPPER U., MADEA B. An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. Journal of Mass Spectrometry, v. 41:633- 640, 2006.

NATALINI C.C., DA CUNHA A.F., LINARDI R.L. Multi-Drug resistance gene (MDR1) and opioid analgesia in horses. Ciência Rural, v.36(1):330- 335, 2006.

NATALINI C.C., CROSIGNANI N., LINARDI R. First report on orally administered methadone to multi-drug resistance (mdr1) gene normal horses. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35:97-100, 2007a.

NATALINI C.C. *Teoría e Técnicas em Anestesiologia Veterinária*. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2007b.

NEFF M.W., ROBERTSON K.R., WONG A.K., SAFRA N., BROMAN K.W., SLATKIN M., MEALEY K.L., PEDERSEN N.C. Breed distribution and history of canine mdr1-1Δ, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 101(32):11725- 11730, 2004.

NOLAN A.M. Pharmacology of Analgesic Drugs. In: *Pain Management in Animals*, Flecknell P.A. & Waterman-Pearson A. 1st ed., London: WB Saunders, p. 21-52, 2000.

OBERLE R.L.; AMIDON G.L. The influence of variable gastric-emptying and intestinal transit rates on the plasma-level curve of cimetidine: an explanation for the double peak phenomenon. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v. 15(5):529- 544, 1987.

OLSEN G.D. Methadone binding to human plasma proteins. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 14:338- 343, 1973.

PERGOLIZZI J., RAINER H.B., BUDD K., DAHAN A., ERDINE S., HANS G., KRESS H-G., LANGFORD R., LIKAR R., RAFFA R.B., SACERDOTE P. Consensus Statement: Opioids and the Management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with foccus on the six clinically most often used world health organization step II opioids

(Buprenorphine, fentanil, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone).
Pain Practice, v.8 (4): 287-313, 2008.

PLUSQUELLEC Y., EFTHYMIPOULOS C., DUTHIL P., HOUIN G. A pharmacokinetic model for multiple sites discontinuous gastrointestinal absorption. Medical Engineering and Physics, v. 21:525- 532, 1999.

POLLI J.E., BIGORA S., PISCITELLI D.A., STRAUGHN A.B., YOUNG D. „Pavlovian’ food effect on the enterohepatic recirculation of piroxicam. Biopharmaceutics and Drug Disposition, v. 17(7):635- 641, 1996.

RAEKALLIO M.R., RÄIHÄ M.P., ALANEN M.H., SARÉN N.M., TUOVIO T.A. Effects of medetomidine, L-methadone, and their combination on arterial blood gases in dogs. Veterinary Anaesthesia and Analgesia, v. 36:158- 161, 2009.

REISFIELD G.M., WILSON G.R. Rational use of sublingual opioids in palliative medicine. Journal of Palliative Medicine, v. 10(2): 465- 474, 2007.

RELLING M.V. & GIACOMINI K.M. Farmacogenética. In: Goddman & Gilman, Las bases farmacológicas de la Terapéutica, 11^a ed., Colombia: McGraw-Hill Interamericana, p. 93- 116, 2007.

SCHINKEL A.H., WAGENAAR E., van DEEMTER L., MOL C.A., BORST P. Absence of mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. Journal of Clinical Investigation, v. 96:1698- 1705, 1995.

SHARGEL L., WU-PONG S., YU A.B.B.C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SHOJAEI A.H. Buccal Mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 1:15- 30, 1998.

TAUB M.E., PODILA L., ELY D., ALMEIDA I. Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-gP) probe substrates: influence of cell line and modulator concentration on P-gp activity. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 33:1679-1687, 2005.

TRESCOT A.M., DATTA S., LEE M., HANSEN H. Opioid Pharmacology. *Pain Physician 2008: Opioid Special Issue*, v. 11:133- 153, 2008.

TREPANIER L.A. Cytochrome P450 and its role in veterinary drug interactions. In: *Veterinary Clinics, Small Animal Practice*, v. 36:975- 985, 2006.

TURNBOU J.M., THAETE L.G., PETERS M.A. Intestinal absorption and biliary excretion kinetics of ¹⁴C-labeled methadone in the rat. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v. 221(2):311- 322, 1976.

WANG Y.X., ROY A., SUN L., LAU C.E. A double-peak phenomenon in the pharmacokinetics of alprazolam after oral administration. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 27:855- 859, 1999.

WALSH P.S., METZGER D.A., HIGUCHI R. Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*, v.10(4):506- 513, 1991

WEINBERG D.S., INTURRISI CH.E., REIDENBERG B., MOULIN D.E., NIP T.J., WALLENSTEIN S., HOUDE R.W., FOLEY K.M. Sublingual absorption of selected opioid analgesics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v.44(3): 335-342, 1988.

WOLFF K., HAY A.W., RAISTRICK D. CALVERT R. Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 44:189- 194, 1993.

WONG Y.H., NEW D.C. The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals*, v. 11:197-212, 2002.

YIN O.Q.P., TOMLINSON B., CHOW A.H.L. CHOW M.S.S. A modified two-portion absorption model to describe double-peak absorption profiles of ranitidine. *Clinical pharmacokinetics*, v. 42(2):179- 199, 2003.

ZHOU H. Pharmacokinetics strategies in deciphering atypical drug absorption profiles. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 43: 211- 227, 2003.

9 ANEXOS

ANEXO 1

Concentrações séricas (ng/mL) da metadona administrada pela via i.v. na dose de 0,5 mg/kg para cada animal, com sua média e desvio padrão.

Tempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média	D.P.
0	51,92	143,26	1714,42	1812,91	930,63	963,47
0,17	47,10	110,64	1035,85	879,39	518,25	512,01
0,25	29,78	55,41	258,89	286,58	157,67	133,76
0,5	26,46	39,23	132,32	103,70	75,43	50,81
0,75	20,52	30,22	129,65	42,20	55,65	50,13
1	21,98	33,43	125,42	44,97	56,45	46,93
1,5	21,38	29,04	111,21	43,52	51,29	40,99
2	20,38	24,71	100,59	33,18	44,72	37,63
2,5	20,80	18,53	88,63	27,95	38,98	33,34
4	10,44	17,89	32,99	19,04	20,09	9,41
6	5,50	9,51	23,08	16,84	13,73	7,80

D.P.: Desvio Padrão

Parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona i.v. 0,5 mg/kg (n = 4).

Parâmetros Farmacocinéticos	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média	D.P.
λ (min ⁻¹) 3 ult	0,38	0,20	0,37	0,14		
correl 3 ult	0,99	0,92	0,94	0,93		
λ (h ⁻¹)	0,38	0,20	0,37	0,14	0,27	0,12
t _{1/2} (min)	1,84	3,51	1,86	4,94	3,04	1,49
ASC _{0-t} (ng·h/mL)	100,65	151,27	705,79	481,11	359,70	285,81
ASC _{extr} (ng·h/mL)	14,60	48,19	61,83	120,07	61,17	44,00
ASC _{0-∞} (ng·h/mL)	115,25	199,46	767,62	601,17	420,87	313,67
% extrapolado da ASC	12,66	24,16	8,05	19,97	16,21	7,22
Cl (L/h/kg)	4,34	2,51	0,65	0,83	2,08	1,72
ASMC _{0-t} (ng·h ² /mL)	212,12	57,06	0,00	0,00	67,30	100,23
ASMC _{extr} (ng·h ² /mL)	126,30	846,03	1058,50	2438,05	1117,22	966,69
ASMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	338,42	903,09	1058,50	2438,05	1184,51	891,12
MRT (h)	2,94	4,53	1,38	4,06	3,22	1,40
Vd (L/kg)	12,74	11,35	0,90	3,37	7,09	5,84

D.P.: Desvio Padrão

Cálculos Farmacocinéticos obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona i.v. 0,5 mg/kg (n = 4).

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Perfil Medio	Media	D.P.
a	1831	1383	87864	11252	14958	25582,5	41769,598
B	28,26	39,8	172	66	78,62	76,515	65,585788
Alfa	26,61	17,4	27	15,5	20,69	21,6275	6,0306737
Beta	0,236	0,244	0,343	0,302	0,312	0,28125	0,0505923
MSC	2,45	3,5	4,156	3,24	4,95	3,3365	0,7055747

D.P.: Desvio Padrão

Cálculos Farmacocinéticos obtidos por abordagem compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona i.v. 0,5 mg/kg (n = 4).

		Perfil Medio	Média	D.P.
$(a*\beta+b*\alpha)/(a+b)$	K_{21}	0,42	0,54	0,17
$((a+b)*\alpha*\beta)/(\beta*a+alfa*b)$	K_{10}	15,42	12,79	7,54
$(a*b*(\beta-\alpha)^2)/(a+b*(\beta*a+\alpha*b))$	K_{12}	958,00	934,31	617,66
$(a/\alpha+(b/\beta))$	ASC_{∞}	974,95	1282,83	1684,14
$D/(a+b)$	V_c	0,07	0,17	0,17
$K_{10}*V_c$	Cl_{TOT}	1,03	1,34	1,20
$((a*\beta^2+b*\alpha^2)/(a*\beta+b*\alpha)^2)*D$	Vd_{SS}	0,44	3,34	3,63
$(k_{10}*k_{21})/(k_{21}+k_{12})$	ke	0,01	0,01	0,00
Cl_{TOT}/β	$Vd_{\acute{a}rea}$	3,29	5,46	5,22
D/b	Vd_{extr}	6,36	10,18	6,37
$0,693/\alpha$	$t_{1/2\alpha}$	0,03	0,03	0,01
$0,693/\beta$	$t_{1/2\beta}$	2,22	2,52	0,44

D.P.: Desvio Padrão

ANEXO 2

Concentrações séricas (ng/ml) da metadona em comprimido via oral na dose de 0,5 mg/kg, coadministrada com cetoconazol (n=4).

Tempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média	D.P.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
0,25	5,37	7,49	6,84	145,05	41,19	69,25
0,5	16,47	86,55	12,52	38,49	38,51	34,01
0,75	2,48	4,59	7,25	69,13	20,86	32,24
1	1,92	12,19	13,00	2,29	7,35	6,07
1,5	4,86	33,16	29,35	4,70	18,02	15,36
2	63,79	24,60	30,25	7,01	31,41	23,75
2,5	23,54	10,64	25,78	6,64	16,65	9,44
4	3,91	1,86	3,70	1,54	2,75	1,23

D.P.: Desvio Padrão

Parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados serológicos resultante de metadona em comprimido pela via oral 0,5 mg/kg coadministrada com cetoconazol (n = 4).

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Media	D.P.
λ (min^{-1}) 3 ult	1,35	1,26	1,11	0,81	1,13	0,24
correl 3 ult	0,99	1,00	0,98	0,98	0,99	0,01
λ (h^{-1})	1,35	1,26	1,11	0,81	1,13	0,24
$t_{1/2}$ (min)	0,51	0,55	0,63	0,86	0,64	0,15
ASC_{0-t} (ng·h/mL)	67,60	70,14	69,88	77,68	71,33	4,39
ASC_{extr} (ng·h/mL)	2,90	1,47	3,34	1,91	2,41	0,86
$ASC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	70,49	71,62	73,23	79,58	73,73	4,06
% extrapolado da ASC	4,11	2,06	4,57	2,40	3,28	1,24
Cl (L/h/kg)	1,21	1,19	1,16	1,07	1,16	0,06
$ASMC_{0-t}$ (ng·h ² /mL)	141,59	98,37	136,04	59,45	108,86	38,13
$ASMC_{extr}$ (ng·h ² /mL)	13,73	22,26	61,25	22,91	30,04	21,23
$ASMC_{0-\infty}$ (ng·h ² /mL)	155,32	120,62	197,29	82,36	138,90	49,02
MRT (h)	2,20	1,68	2,69	1,03	1,90	0,71
Vd (L/kg)	2,66	2,00	3,13	1,11	2,22	0,88
Biodisponibilidade %					18	

D.P.: Desvio Padrão

ANEXO 3

Concentrações séricas (ng/ml) da metadona líquida administrada pela via bucal na dose de 0,5 mg/kg para cada animal, com sua média e desvio padrão.

Tempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Média	D.P.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,08	8,30	5,70	148,56	54,19	81,74
0,17	28,28	13,42	102,24	47,98	47,57
0,25	28,45	3,22	92,11	41,26	45,81
0,5	17,84	3,34	85,05	35,41	43,60
0,75	13,14	2,40	68,90	28,15	35,70
1	7,35	2,66	29,22	13,08	14,18
1,5	5,55	2,37	11,17	6,36	4,46
2	10,03	2,30	11,06	7,80	4,79
2,5	6,95	1,57	4,42	4,31	2,69
4	1,30	1,29	3,34	1,98	1,18

D.P.: Desvio Padrão

Parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona líquida pela via bucal 0,5 mg/kg (n = 3).

Parâmetros PK	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Média	D.P.
λ (min^{-1}) 3 ult	0,71	0,25	0,50	0,49	0,23
correl 3 ult	1,00	0,89	0,84	0,91	0,08
λ (h^{-1})	0,71	0,25	0,50	0,49	0,23
$t_{1/2}$ (min)	0,98	2,74	1,38	1,70	0,92
ASC _{0-t} (ng·h/mL)	37,54	9,62	118,37	55,17	56,48
ASC _{extr} (ng·h/mL)	1,84	5,11	6,63	4,53	2,45
ASC _{0-∞} (ng·h/mL)	39,38	14,72	125,00	59,70	57,88
% extrapolado da ASC	4,67	34,68	5,31	14,89	17,15
CI (L/h/kg)	1,84	4,92	0,58	2,45	2,24
ASMC _{0-t} (ng·h ² /mL)	38,46	10,75	102,81	50,67	47,23
ASMC _{extr} (ng·h ² /mL)	30,99	34,28	46,44	37,24	8,13
ASMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	69,46	45,03	149,25	87,91	54,51
MRT (h)	1,76	3,06	1,19	2,01	0,96
Vd (L/kg)	3,25	15,06	0,69	6,33	7,67
Biodisponibilidade %				15	

D.P.: Desvio Padrão

ANEXO 4

Concentrações séricas (ng/ml) da metadona líquida administrada por gavagem na dose de 0,5 mg/kg para cada animal, com sua média e desvio padrão.

Tempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Média	D.P.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	7,98	6,60	6,80	7,13	0,75
0,5	7,86	7,57	4,98	6,80	1,59
0,75	5,26	4,32	3,57	4,38	0,85
1	3,77	3,38	2,32	3,16	0,75
1,5	2,65	3,44	3,49	3,19	0,47
2	2,33	4,31	3,23	3,29	0,99
2,5	1,77	2,65	1,40	1,94	0,64

D.P.: Desvio Padrão

Parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem não-compartimental a partir dos dados serológicos resultante da administração de metadona líquida por gavagem. 0,5 mg/kg (n = 3).

Parâmetros PK	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Média	D.P.
λ (min^{-1}) 3 ult	0,40	0,97	0,91	0,76	0,31
correl 3 ult	0,98	1,00	0,90	0,96	0,05
λ (h^{-1})	0,40	0,97	0,91	0,76	0,31
$t_{1/2}$ (min)	1,72	0,71	0,76	1,06	0,57
ASC_{0-t} (ng·h/mL)	9,62	10,43	8,42	9,49	1,01
ASC_{extr} (ng·h/mL)	4,39	2,72	1,53	2,88	1,43
$\text{ASC}_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	14,01	13,15	9,95	12,37	2,14
% extrapolado da ASC	31,31	20,71	15,40	22,48	8,10
Cl (L/h/kg)	1,07	1,14	1,51	1,24	0,23
ASMC_{0-t} (ng·h ² /mL)	9,31	11,98	9,31	10,20	1,54
$\text{ASMC}_{\text{extr}}$ (ng·h ² /mL)	21,83	9,61	5,51	12,32	8,49
$\text{ASMC}_{0-\infty}$ (ng·h ² /mL)	31,14	21,59	14,82	22,52	8,20
MRT (h)	2,22	1,64	1,49	1,78	0,39
Vd (L/kg)	2,38	1,87	2,25	2,17	0,26
Biodisponibilidade %				03	

D.P.: Desvio Padrão