



# Determinação de cetamina em plasma por HPLC: aplicação em um estudo de farmacocinética de associação medicamentosa em cães

Amorim, R.<sup>1</sup>; Galhardo, A.<sup>2</sup>; Valadão, C.A.A.<sup>2\*</sup>; Peccinini, R.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

Recebido 17/04/2008 - Aceito 18/07/2008

## RESUMO

A S(+) cetamina é um fármaco amplamente utilizado na medicina para induzir anestesia e a associação com midazolam é empregada para minimizar seus efeitos adversos. Associações medicamentosas podem resultar em interações farmacocinéticas e a disponibilidade de métodos bioanalíticos para a determinação da cetamina em plasma constitui ferramenta útil para a avaliação do perfil cinético do fármaco administrado isoladamente ou em associação. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de um método analítico para determinação da cetamina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a investigação do perfil farmacocinético da cetamina em quatro cães hípidos da raça Beagle. A S(+) cetamina (10mg/kg) foi administrada pela veia cefálica em dose única isoladamente (protocolo I) ou associada ao midazolam (0.2mg/kg) (protocolo II) em estudo cruzado com intervalo de uma semana para wash-out. Amostras seriadas de sangue foram coletadas no intervalo de oito horas e analisadas por HPLC para a avaliação do perfil farmacocinético utilizando modelo bicompartimental. O método bioanalítico apresentou limites de confiança aceitáveis para sua aplicação em estudos de farmacocinética e os parâmetros área sob a curva (ASC<sup>0-8</sup>), volume de distribuição (Vd), clearance total (Cl), meia vida de eliminação (t<sub>1/2</sub> β), constante de eliminação (β), meia vida de distribuição (t<sub>1/2</sub> α) e constante de distribuição (α) não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos (p < 0.05, Wilcoxon). Os resultados obtidos sugerem que a redução dos efeitos colaterais da cetamina decorrente do uso da associação cetamina-midazolam não está relacionada a alterações no perfil farmacocinético da cetamina.

*Palavras-chave:* cetamina; farmacocinética; anestesia; midazolam; cães.

## INTRODUÇÃO

As associações medicamentosas são de uso freqüente na terapêutica e podem resultar em interações nas fases pré-cinética, farmacocinética e farmacodinâmica.

A significância clínica dessas interações é evidente, uma vez que podem resultar em efeitos farmacológicos inesperados, com aumento ou uma diminuição da eficácia terapêutica. Da mesma maneira, a interação pode acentuar ou atenuar os efeitos indesejáveis (Fuhr, 2000; Oga et al., 2002; Hardman & Limbird, 2003).

Apesar do amplo uso de associações medicamentosas na terapêutica, as interações que podem ocorrer como resultado dessas associações nem sempre são satisfatoriamente elucidadas de maneira a garantir a segurança dessa utilização.

A S(+) cetamina é um fármaco amplamente utilizado na medicina para a indução e manutenção da anestesia e administrado pelas vias intravenosa, intramuscular, oral, retal e nasal. Sua alta lipossolubilidade confere rápida e curta duração de ação após dose única, possui baixa ligação às proteínas plasmáticas (27%) quando comparada com outros anestésicos de uso parenteral e seu metabolismo envolve principalmente a isoforma CYP2B6. A N-demetilação da S(+)-cetamina leva à formação de norcetamina e a oxidação do anel ciclohexanona leva à produção de dehidronorcetamina. Ambos os metabólitos possuem atividade farmacológica e são eliminados na urina (Landoni & Soraci, 1997; Valadão, 2002; Evers & Crowder, 2003; Roncada et al., 2003).

Geralmente o efeito anestésico da cetamina é acompanhado de efeitos adversos significativos, como aumento do tônus muscular e excitabilidade com grande agitação psicomotora, efeito que representa a maior restrição do uso da cetamina (Ivani et al., 2003). Em cães a administração de 5mg/kg provoca considerável aumento da pressão intraocular (Hofmeister et al., 2006).

A S(+)-cetamina é usualmente administrada em associações com outros fármacos, sendo recomendado o uso de sedativos para minimizar os seus efeitos adversos – especialmente a agitação psicomotora – e o uso da associação cetamina-benzodiazepínico tem sido especialmente utilizada para esse fim.

O midazolam é um benzodiazepínico que é considerado como primeira escolha para a associação com a cetamina na indução e manutenção anestésica devido à sua hidrossolubilidade e miscibilidade com a solução de S(+)-cetamina (Brown et al., 1993). O midazolam sofre

\*Autor correspondente: Carlos Augusto Araújo Valadão - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, UNESP - Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - CEP: 14884-900 - Jaboticabal - SP, Brasil - Telefone: (16) 3209-2631 - FAX: (16) 3209-2632 e-mail: valadao@fcav.unesp.br

metabolismo oxidativo para formar os derivados 1-hidroxi, 4-hidroxi e 1,4 dihidroximidazolam, que conjugam-se com ácido glicurônico para serem excretados. Em humanos, esse processo oxidativo é relacionado à CYP3A4 (Kronbach et al., 1989).

Em ratos a isoforma CYP2C11 também é relacionada a esse processo (Kobayashi et al., 2002; Cortright & Craigmill, 2006). No entanto, apesar das similaridades entre os mamíferos é necessário ressaltar-se a existência de diferenças entre espécies no conteúdo e atividade das isoformas do CYP450. De acordo com Baririan et al. (2006) o conteúdo de CYP450 para cães é duas vezes superior do que aquele encontrado em ratos mas a atividade enzimática em ratos é superior àquela encontrada em cães.

Assim, ressalte-se que ambos os fármacos – cetamina e midazolam – sofrem processo oxidativo durante seu metabolismo e que podem existir diferenças inter-espécies no conteúdo e atividade dos sistemas enzimáticos, com possibilidade de competição por esses sistemas quando os fármacos são administrados simultaneamente.

Outro aspecto relevante com relação a farmacocinética dos produtos em questão é que, segundo Björkman et al. (1992), a cetamina e o midazolam administrados isoladamente diminuem o fluxo sanguíneo cerebral com conseqüente diminuição do seu próprio transporte até esse compartimento. É possível que a associação desses fármacos leve ao aparecimento de efeito diferenciado nesse aspecto de distribuição de cada um desses fármacos com conseqüente interferência no perfil farmacocinético.

Ainda, segundo Roncada et al. (2003), apesar do extenso uso da associação cetamina-midazolam em medicina veterinária, são escassas as informações relacionadas às suas possíveis interações.

Finalmente, as diferenças clínicas resultantes da associação cetamina-midazolam levam à expectativa de que possam ocorrer alterações no perfil farmacocinético da cetamina, assim como do midazolam. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para a determinação de cetamina em plasma por HPLC - uma vez que estudos em farmacocinética requerem a existência de um método bioanalítico sensível e específico, com limites de confiança adequados - e a avaliação do perfil farmacocinético da cetamina administrada isoladamente e na associação com midazolam em cães, procurando evidenciar as possíveis alterações nos seus parâmetros farmacocinéticos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Soluções padrão, reagentes e solventes**

O padrão de cetamina racêmico e S(+)-cetamina foram cedidos pelo laboratório Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Itapira/SP). A solução estoque de

(S+) cetamina foi preparada em água na concentração de 100 ug/ml. A partir desta solução, foram preparadas as soluções diluídas 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10; 25 e 50 ug de cetamina/ml de água.

Os solventes empregados na fase móvel do sistema cromatográfico acetonitrila (ACN) e metanol foram obtidos da J.T.Baker (U.S.A), grau HPLC. O fosfato de potássio monobásico anidro, utilizado no tampão 0,03mol/L empregado na fase móvel foi obtido da Synth (Brasil). No procedimento de extração foi utilizado acetato de etila Mallinckrodt (México).

Foram preparadas soluções de HCL 50%, NaOH 0,1 N e ácido tricloroacético 10% (TCA) em água, utilizadas no procedimento de extração.

Para os testes de seletividade do método analítico foram utilizados os padrões dos fármacos: diazepam (Novaquímica), amitriptilina (Eurofarma), clorpromazina (União Química), imipramina (Pharmacon), fenobarbital (Vital Brazil), morfina (Cristália), midazolam (Roche).

### **Sistema cromatográfico**

Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters 600 Controller equipado com detector UV Waters 2487 operando a 215 nm, coluna Symmetry® C<sub>18</sub> (5 µm, 4,6 x 150mm), com injetor manual e operando em modo gradiente (Tabela 1), com utilização de pré-coluna Symmetry® C<sub>18</sub> e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,03 mol/L (40%) , acetonitrila (45%), metanol (10%) e água (5%) no fluxo de 1,5ml/min.

### **Procedimento analítico**

As amostras de plasma (400 uL) foram adicionadas de 100 ul de TCA 10% e homogeneizadas em vortex por 30s e em seguida centrifugadas por 8min a 2800 rpm. O sobrenadante (300 ul) foi retirado e basificado com NaOH 0,5N até atingir pH entre 12 e 13. Adicionou-se ao sobrenadante 2ml de acetato de etila, homogeneizando-se em vortex por 30s. Após centrifugação por 8min a 2800rpm foi retirada a fase orgânica (1,7mL) repetindo-se o procedimento de extração com a fase aquosa remanescente. Novamente a fase orgânica foi retirada (1,8mL) e adicionada à fase orgânica da primeira extração. O extrato orgânico foi evaporado à secura sob fluxo de ar. O resíduo foi ressuscitado com 200 uL de água e 50 uL foram injetados no sistema cromatográfico.

### **Validação do Método Analítico**

Os limites de confiança do método analítico foram determinados de acordo com a resolução da ANVISA (Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003) e a publicação de Shah et al. (1992) para a validação de método bioanalíticos aplicados em estudos de bioequivalencia.

#### Curva de calibração em plasma (Linearidade)

A curva de calibração foi construída através da análise de amostras de plasma adicionadas de cetamina na faixa de concentração de 0,25 a 50 µg/mL. As amostras foram analisadas em triplicata.

#### Seletividade

A interferência de outros fármacos no método analítico desenvolvido foi avaliada através da injeção de soluções padrão em concentrações similares às aquelas observadas no plasma quando administrados na dose terapêutica, submetidas ao procedimento de extração estabelecido. Foram testados os seguintes fármacos: diazepam, amitriptilina, clorpromazina, imipramina, fenobarbital, morfina e midazolam.

#### Recuperação

A recuperação da cetamina foi avaliada por comparação entre as áreas dos picos obtidas após extração em plasma e aplicando-se o cálculo de concentração através da equação obtida por injeção direta das soluções de cetamina da curva padrão ( $y=84700x-1410$ ), na qual  $y$  corresponde à área e  $x$  à concentração, obtendo-se a porcentagem de recuperação. Esse estudo foi realizado através da análise, em quatro replicatas, para três concentrações da cetamina: 3; 9 e 30 µg/mL.

#### Precisão intra e inter ensaio

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes de cetamina em triplicata, durante cinco dias consecutivos (inter ensaios), e em cinco replicatas em um mesmo ensaio (intra-ensaio). Para os estudos de precisão da cetamina, as concentrações utilizadas foram de 0,5; 8 e 24 µg/mL.

#### Exatidão

A exatidão do método analítico é a medida da proximidade dos resultados obtidos experimentalmente com os valores teóricos das concentrações do analito nas amostras. A exatidão foi obtida a partir da análise das amostras adicionadas de cetamina utilizadas no ensaio de precisão descritas anteriormente nas concentrações de 0,5; 8 e 24 µg/mL.

#### Limite de Detecção

O limite de detecção foi determinado por meio da análise de amostras de plasma adicionadas de alíquotas de soluções, de diferentes concentrações de cetamina, considerado como sendo a menor concentração determinável

(área média 3x maior que área do branco da amostra) de cetamina, com coeficiente de variação (CV) menor que 20%. As amostras foram analisadas em cinco replicatas.

#### Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado por meio da análise de amostras de plasma adicionadas de alíquotas de soluções, de diferentes concentrações, de cetamina, considerado como sendo a menor concentração quantificável (área média 5x maior que a área do branco da amostra) de cetamina, com coeficiente de variação (CV) menor que 20%. As referentes amostras foram analisadas em cinco replicatas.

#### Animais

Foram utilizados quatro cães, da raça Beagle, fêmeas, pesando entre 10 a 13 quilos, com idade entre cinco e sete anos, adquiridas do Canil Beagland, Cambé-Paraná. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas instalações da Anestesiologia Experimental junto ao Campus de Jaboticabal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/UNESP, em ambiente climatizado (20-24°C) e alimentados com ração industrializada e água *ad libitum*.

Foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma creatinina sérica, uréia, cálcio, fósforo, alanina amino transferase-ALT, aspartato amino transferase-AST, fosfatase alcalina, gama glutaril transferase-GGT, albumina, proteínas totais e glicose) num período anterior ao início do experimento, excluindo-se animais portadores de doenças.

#### Delineamento Experimental

##### Protocolo I (Cetamina 10mg/kg)

O desenvolvimento do protocolo I envolveu a administração de 10 mg/kg de cetamina racêmica pela veia cefálica (IV “bolus”). Foi realizada a coleta seriada de sangue através da veia jugular, em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos 5min, 15min; 30min; 45min; 60min; 90min; 120min; 4h; 6h e 8h após a administração do fármaco. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1800g e o plasma foi estocado a -12°C até a realização das análises.

##### Protocolo II (Cetamina 10mg/kg + midazolam 0,5 mg/Kg)

A execução do protocolo II envolveu a administração de 10mg/Kg de cetamina associada com 0,2mg/Kg de midazolam pela veia cefálica (IV “bolus”). Foi realizada a coleta seriada de sangue através da veia jugular, em seringas heparinizadas (Liquemine® 5000 UI, Roche) nos tempos 5min, 15min; 30min; 45min; 60min; 90min; 120min; 4h; 6h e 8h após a administração. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1800g e o plasma foi estocado a -12°C até a realização das análises.

O estudo foi desenvolvido com dois animais iniciando com o protocolo I e dois animais iniciando com o protocolo II, com período de *wash-out* de sete dias.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/UNESP (processo nº. 007183).

### Análise farmacocinética

A disposição cinética da cetamina foi avaliada após a administração de dose única IV de 10mg/Kg de S(+) cetamina isoladamente ou em associação com midazolam (0,2mg/kg). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas *curvas concentração plasmática x tempo*.

As meias vidas e as constantes de velocidade (absorção, distribuição, eliminação) foram determinadas pelo modelo bicompartimental, que melhor se adaptou aos dados experimentais.

As constantes de velocidade foram calculadas através da equação  $0.693/t_{1/2}$ . As áreas sob as curvas de *concentração plasmática x tempo* ( $AUC^{0-8}$ ) foram calculadas através do método dos trapezóides. O parâmetro *clearance* total foi calculado através da equação  $Cl = \text{dose} / AUC$  e o volume de distribuição através da equação  $Vd = Cl / \beta b$  (Boroujerdi, 2002).

### Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das medianas e IC 95%. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada através da aplicação do teste de Wilcoxon (pareado não paramétrico) utilizando os programas SigmaStat e GraphPad Instat®.

Os cálculos das curvas de calibração e coeficiente de variação (CV%) foram realizados através do programa Origin®.

## RESULTADOS

### Desenvolvimento e Validação do Método Analítico para a determinação de cetamina em plasma por HPLC

O sistema cromatográfico utilizado no presente trabalho proporcionou a obtenção de cromatogramas com adequada separação dos picos de interesse e com boa sensibilidade, conforme demonstrado na Figura 1. O uso do modo gradiente para a eluição da fase móvel não comprometeu a reprodutibilidade dos cromatogramas, uma vez que o intervalo de tempo entre as injeções foi suficiente para o restabelecimento do equilíbrio da proporção inicial de solventes.

Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados relativos ao estudo de seletividade do método analítico.

Os resultados do estudo de recuperação relativa do método estão demonstrados na Tabela 3.

Os resultados dos estudos de precisão inter e intra-ensaios e exatidão estão demonstrados na Tabela 4.

Os limites de detecção e quantificação estão demonstrados na Tabela 5.

### Perfil farmacocinético da cetamina administrada isoladamente e em associação com midazolam e cães hígdos

Os perfis de concentração plasmática versus tempo da cetamina administrada em cães hígdos isoladamente ou em associação com midazolam estão representados na Figura 2 e os parâmetros farmacocinéticos obtidos pela análise da curva estão descritos na Tabela 6.

## DISCUSSÃO

A determinação de cetamina por HPLC em plasma humano e soro equino tem sido descrita na literatura (Needham & Kochhanr, 1975; Takahagi et al., 1986; Geisslinger et al., 1991; Seay et al., 1993; Svensson & Gustafsson, 1996; Bolze & Bouliou, 1998). No entanto, os métodos descritos envolvem procedimentos de derivação ou termoestabilização (Needham & Kochhanr, 1975; Takahagi et al, 1986; Geisslinger et al, 1991; Svensson & Gustafsson, 1996).

A cetamina é um fármaco de caráter básico e constituído por grupamentos amino, que podem interagir com os grupos silanóis presentes nas colunas convencionais não desativadas de maneira irreversível. A

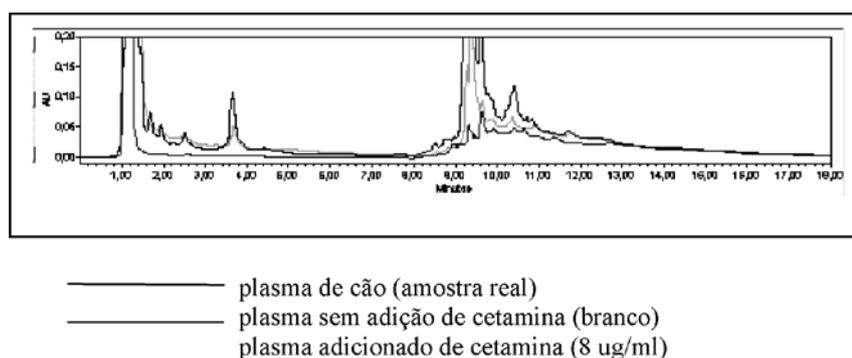


Figura 1. Cromatograma branco, controle e plasma de cão que recebeu cetamina (IV/10mg/kg).

*Determinação de cetamina em plasma por HPLC*

Tabela 1 – Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de cetamina em plasma.

TEMPO	METANOL	ÁGUA	ACETONITRILA	TAMPÃO
5 MIN	10%	5%	45%	40%
6 MIN	10%	5%	80%	5%
17 MIN	10%	5%	45%	40%

Tabela 2 - Estudo de seletividade do método desenvolvido para a determinação de cetamina em plasma por HPLC.

Fármaco	Concentração	Tempo de retenção
cetamina	2 ug/mL	4,0
Diazepam	300 ng/mL	ND*
Amitriptilina	70 ng/mL	ND*
Clorpromazina	100 ng/mL	2,8
Imipramina	200 ng/mL	ND*
Fenobarbital	25 ug/mL	3,1
Morfina	200 ng/mL	ND*
Midazolam	120 ng/mL	ND*

\*ND: não detectado no intervalo de tempo de 20 min

Tabela 3 - Estudo de recuperação do método analítico

Concentração	Recuperação	CV
Cetamina (ug/mL)	(%)	(%)
3	105	6,7
9	101,9	7,7
30	98,9	5,2

Tabela 4 - Estudo de Precisão e exatidão Intra e Inter-ensaio

Concentração Cetamina (ug/mL)	Intra-ensaio (n=5)		Inter-ensaio (n=3)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (ES%)	Precisão (CV%)	Exatidão (ES%)
0,5	2,6	15	11,7	14,9
8	10,1	-6,4	8,7	-12,0
24	5,7	3	6,8	-5,9

CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

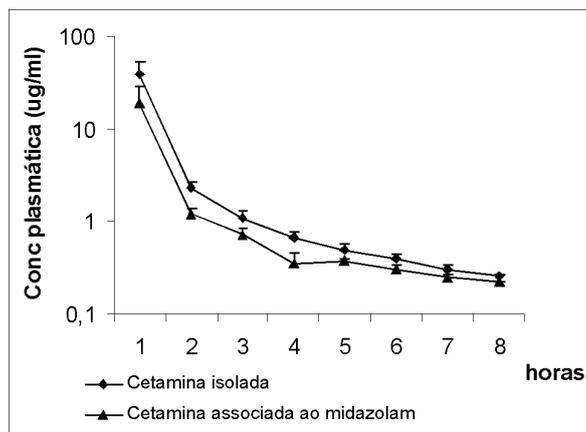


Figura 2. Representação esquemática do perfil farmacocinético da cetamina administrada em cães híidos (n=4).

Tabela 5 - Limites Detecção e Quantificação

Cetamina (ug/mL)			
Limite Detecção	CV%	Limite Quantificação	CV%
0,125	12,92	0,250	15

CV= coeficiente de variação

Tabela 6 - Parâmetros farmacocinéticos da cetamina calculados a partir da administração em animais (n=4).

Parâmetros	Cetamina (ug/mL)	
	Protocolo I Medianas (IC 95%)	Protocolo II Medianas (IC 95%)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,120 (0,038-0,257)	0,135 (0,088-0,512)
$\alpha$ ( $h^{-1}$ )	5,775 (2,482-8,144)	5,198 (0,877-8,478)
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,95 (1,28-9,73)	5,19 (0,87-8,47)
$\beta$ ( $h^{-1}$ )	0,243 (0,022-0,456)	0,189 (0,022-0,451)
AUC <sup>0-∞</sup> (ug/ml.h)	5,76 (0,74-11,84)	2,6 (0,62-8,34)
Cl (L/kg.h)	1,83 (0,21-3,84)	3,86 (1,03-5,77)
Vd (L/kg)	11,80 (3,13-16,66)	15,35 (3,03-28,69)

$t_{1/2\alpha}$  : meia vida de distribuição;  $\alpha$ : constante de distribuição;  $t_{1/2\beta}$ : meia vida de eliminação;  $\beta$ : constante de eliminação; AUC<sup>0-∞</sup> : área sob a curva concentração plasmática versus tempo no intervalo de tempo zero a infinito; Cl: clearance total e Vd : volume de distribuição. Os parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas significativas. (Wilcoxon)

coluna Symmetry®, utilizada no sistema cromatográfico, é constituída por cadeia de carbono quimicamente ligada ao suporte de sílica com tratamento prévio por silanização para desativação dos grupos silanóis do suporte, o que minimiza as interações por pontes de hidrogênio dos grupamentos amino com os grupos silanóis do suporte de sílica, favorecendo a obtenção de picos simétricos com maior resolução cromatográfica, conforme pode ser observado na Figura 1. O tempo de retenção da cetamina foi de quatro minutos e não foram observados picos em amostras de plasma de cães não tratados com cetamina (branco) na região de interesse.

O estudo de linearidade na faixa de concentrações proposta para a execução do trabalho mostrou coeficiente de correlação adequado e o estudo de recuperação para o procedimento de extração com um único solvente - acetato de etila - em pH básico resultou em valores próximos a 100% de rendimento. Bolze & Bouliou (1998), apresenta resultados semelhantes utilizando a combinação dos solventes diclorometano e acetato de etila (aproximadamente 90% de recuperação).

No estudo de seletividade foi possível detectar os fármacos imipramina e fenobarbital, porém em tempos de retenção diferentes do apresentado pela cetamina no sistema cromatográfico. A não detecção do midazolam no sistema proposto foi fundamental para a continuidade do estudo, uma vez que o protocolo experimental envolvia a administração do fármaco associado à cetamina.

Os estudos de precisão e exatidão intra e inter-ensaios resultaram em valores de coeficiente de variação abaixo de 15%, considerados satisfatórios para o método bioanalítico.

Os valores de limite de quantificação (250ng/mL) e limite de detecção (125ng/mL) foram igualmente considerados satisfatórios para a aplicação do método em estudo de farmacocinética. Bolze & Bouliou (1998) reportam o valor de 500ng/mL para o limite de detecção do método desenvolvido com aplicação satisfatória em estudo de cinética.

As concentrações plasmáticas máximas observadas cinco após a administração da dose de 10mg/kg de cetamina isolada ou associada com midazolam foram  $35.1 \pm 5.1$  ug/mL e  $18.7 \pm 6.5$  ug/mL, respectivamente e não mostraram diferenças estatísticas significativas.

Os parâmetros  $Cl_t$  e  $V_d$  obtidos em ambos os grupos também não demonstraram diferenças estatísticas significativas. O mesmo foi obtido para os parâmetros  $AUC^{0-T}$ ,  $AUC^{0-inf}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $kel$ ,  $t_{1/2\alpha}$  e  $k\alpha$ .

Considerando a baixa ligação as proteínas plasmáticas da cetamina é improvável que ocorra competição entre os dois fármacos por esse sítio de ligação.

Ainda, a S(+) cetamina é metabolizada pelo CYP450, principalmente pela isoforma CYP2B6, enquanto que o midazolam sofre metabolismo oxidativo principalmente pela isoforma CYP3A em humanos e ratos, com contribuição da isoforma CYP2C11 (Kronbach et al., 1989; Baririan et al., 2006).

Apesar das semelhanças encontradas no metabolismo dos mamíferos é necessário ressaltar a existência de diferenças interespecies no conteúdo e atividade de CYP450. Baririan et al. (2006) relatam que o conteúdo de CYP450 em cães é duas vezes superior ao encontrado em ratos, porém sua atividade enzimática é inferior.

Esses achados sugerem que não há competição entre os fármacos pelos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo, e então, o CI hepático deve ser o mesmo na administração da associação medicamentosa. Considerando que a eliminação da cetamina é essencialmente dependente do metabolismo, o uso da associação não deve levar a interferências na meia vida ou clearance.

É possível observar rápido declínio dos níveis plasmáticos da S(+)cetamina, com meia vida de distribuição e eliminação relativamente curtas, caracterizando um perfil de não acumulação do fármaco no sistema biológico. A co-administração do midazolam não interfere nessa característica.

Finalmente, os efeitos clínicos observados na co-administração de cetamina-midazolam na indução da anestesia e a ausência de diferenças no perfil farmacocinético da cetamina na associação medicamentosa sugerem que os efeitos dessa associação não é decorrente de interação farmacocinética.

O método bioanalítico desenvolvido neste trabalho apresenta limites de confiança satisfatórios para a aplicação em estudos de farmacocinética e os perfis farmacocinéticos da cetamina administrada isoladamente e em associação não apresentam diferenças estatísticas significativas, sugerindo que não há interação farmacocinética na associação utilizada para a indução e manutenção anestésica.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de Iniciação Científica para a execução deste trabalho.

## ABSTRACT

*HPLC determination of ketamine in plasma: application in a pharmacokinetic study of drug – drug association in dogs.*

**S(+)-ketamine is a drug widely used in human and veterinary medicine to induce anesthesia and midazolam has been co-administered with S(+)-ketamine to avoid adverse effects. Such drug associations can result in pharmacokinetic interactions and an analytical method to measure plasma concentrations of ketamine would be an useful tool to study the pharmacokinetic profile of a drug administered alone or in association. In the present work a method based on HPLC was developed and validated for the determination of ketamine in plasma samples. The pharmacokinetic parameters of**

**S(+)** ketamine administered alone or in combination with midazolam to four healthy female beagle dogs were also investigated. S(+)-ketamine (10mg/kg) was injected IV (cephalic vein) alone (protocol I) or combined with midazolam (0.2mg/kg) (protocol II) in a crossover design with a washout period of seven days. Blood samples were collected before and up to eight hours after dosing. Plasma concentrations of S(+)- ketamine were analyzed by HPLC/UV and the main pharmacokinetic parameters were derived from a bi-compartmental model. The bioanalytical method presented acceptable confidence limits for application in pharmacokinetic studies and the parameters obtained, area under curve (AUC<sup>0-8</sup>), volume of distribution (Vd), total clearance (Cl<sub>T</sub>), elimination half-life (t<sub>1/2</sub>), elimination rate (β), distribution half-life (t<sub>1/2α</sub>) and distribution rate (α) did not show statistically significant differences between the groups (P < 0.05, Wilcoxon's test). The S(+)-ketamine-midazolam combination has been used to reduce the dissociative side effects of ketamine, such as excitement and catalepsy. The present results suggest that this feature is not related with pharmacokinetic alteration of the S(+)-ketamine.

**Keywords:** S(+)-ketamine; pharmacokinetics; anesthesia; midazolam; dogs.

## REFERÊNCIAS

- Baririan N, Desager JP, Petit M, Horsman Y. CYP3A4 activity in four different animal species liver microsomes using 7-benzyloxyquinoline and HPLC/spectrofluorometric determination. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40:211-4.
- Björkman S, Akesson J, Nilsson F, Messeter K, Roth B. Ketamine and midazolam decrease cerebral blood flow and consequently their own rate of transport to the brain: an application of mass balance pharmacokinetics with a changing regional blood flow. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1992; 20(6):637-52.
- Bolze S, Bouliou R. HPLC determination of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in plasma with a high-purity reversed-phase sorbent. *Clin Chem* 1998; 44(3):560-4.
- Boroujerdi M. *Pharmacokinetics principles and applications*. New York: Mc Graw-Hill, 2002; p.331-41.
- Brown SA, Jacobson JD, Hartsfield SM. Pharmacokinetics of midazolam administered concurrently with ketamine after intravenous bolus or infusion in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1993; 16:419-25.
- Cortright KA, Craigmill AL. Cytochrome P450-dependent metabolism of midazolam in hepatic microsomes from chickens, turkeys, pheasant and bobwhite quail. *J Vet Pharmacol Ther* 2006; 29:469-76.
- Evers A, Crowder CM. Anestésicos Gerais In: Hardman JG, Limbird LE (eds). *Goodman & Gilman*. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003; p.257-72.
- Fuhr, U. Induction of drug metabolizing enzymes: pharmacokinetic and toxicology consequences in humans. *Clin Pharmacokinetic* 2000; 38(6):493-504.
- Geisslinger G, Menzel-Sogloweski, Kamp HD, Brune K. Stereoselective high performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of ketamine and norketamine in plasma. *J Chromatogr* 1991; 568:165-76.
- Hardman JG, Limbird LE. *Goodman & Gilman*. As bases farmacológicas da terapêutica. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003. p.955-61.
- Hofmeister EH, Mosunic CB, Torres BT, Ralph, AG, Moore PA, Rood MR. Effects of ketamine, diazepam, and their combination on intraocular pressures in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2006; 67:1136-9.
- Ivani G, Vercellino C, Tonetti F. Ketamine: a new look to an old drug. *Minerva Anestesiologica* 2003; 69:468-71.
- Kobaiashy K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P 450 (CYP) isoforms: screening with DNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:889-96.
- Kronbach T, Mathys D, Umeno N, Gonzalez FJ, Mexer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450 IIIA4. *Mol Pharmacol* 1989; 36:89-96.
- Landoni MF, Soraci AL, Delatour P, Lees P. Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20:1-16.
- Needham LL, Kochhanr MM. Determination of ketamine and some in vivo metabolites using high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* 1975; 114:220-2.
- Oga S, Basile AC, Carvalho MF. *Medicamentos e suas interações*. São Paulo: Atheneu, 2002. 199p.
- Roncada P, Zaghini A, Riciputi C, Romagnoli N, Spadari A. Kinetics of ketamine plasma and urine metabolite levels following intravenous administration in the dog. *Vet Res Commun* 2003; 27(suppl 1):433-6.
- Seay SS, Aucoin DP, Tyczkowska KL. Rapid high performance liquid chromatographic method for determination of ketamine and its metabolite dehydronorketamine in equine serum. *J Chromatogr* 1993; 620:281-7.
- Shah UP, Midha KK, Dighe S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci* 1992; 81:309-12.
- Svensson JO, Gustafsson LL. Determination of ketamine and norketamine enantiomers in plasma by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1996; 678:373-6.
- Takahagi H, Inoue K, Horiguchi M. Drug monitoring by a fully automated high performance liquid chromatographic technique involving direct injection of plasma. *J Chromatogr* 1986; 352:369-79.
- Valadão CAA. Anestésicos dissociativos. In: Fantoni DT, Cortopassi SR. *Anestesia em cães e gatos*. São Paulo: Roca; 2002. p.167-73.