

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia

Nadia Crosignani Outeda

**Estudo Farmacocinético e Farmacodinâmico do cloridrato
metadona por via oral, intramuscular e intravenosa e carreadores
lipídicos nanoparticulados de metadona via oral em equinos**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de
Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor em Anestesiologia.**

Prof. Titular Stelio Pacca Loureiro Luna

Orientador

Profa. Teresa Dalla Costa

Co-orientadora

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Crosignani, Nadia.

Estudo farmacocinético e farmacodinâmico do cloridrato metadona por via oral, intramuscular e intravenosa e carreadores lipídicos nanoparticulados de metadona via oral em equinos / Nadia Crosignani. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Stelio Pacca Loureiro Luna

Capes: 50501011

1. Cavalo. 2. Analgésicos - Efeitos fisiológicos. 3. Farmacocinética. 4. Nanopartículas.

Palavras-chave: Cavalo; Farmacocinética; Metadona; Nocicepção.

DEDICATÓRIA

Bruno *Piá* Ferreira (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Turquesa, Esquecida, Marjory, Mogiana, Planeta e Zaira, gratidão.

Minha gratidão ao Stelio, pelo apoio e incentivo às ideias. Pelos ensinamentos que me fizeram evoluir como ser humano nestes anos. Pela medicina chinesa e um novo repensar da veterinária e do meu trabalho. Pela ética e bioética. Por me ensinar a dizer não. Por sempre estar quando precisei. Por colocar primeiro minha pessoa, antes do estudo ou a pesquisa.

Professora Teresa, que sempre me acolhe na sua equipe e apoia nos estudos, com profissionalismo e carinho, gracias! Você despertou meu lado farmacêutico!

Professora Silvia, obrigada por me abrir as portas desde o início no seu laboratório e colaborado, junto com a equipe do laboratório 405.

Prof. Ludovic, thanks for all the explanations, for helping me in this start on the study and understanding of pharmacokinetics. You're a great mentor!

Prof. Nicolau, obrigada pela parceria, por abrir as portas da Edgardia, sem você nada disto seria possível.

Ao Eutálio, vulgo Mineirito: acabaste trabalhando com nanos e farmacocinética! E não vem dizer que tu não curtiste: foram ótimas as horas de colheitas. Obrigada pelo compromisso e parceria!

As meninas das nanos: Cássia, Cris e Franciele, obrigada pelo empenho e dedicação!

À equipe do CBIM: Maiara (e Molly), Bruna, Nanda, Carol e todo grupo do laboratório, obrigada pelo trabalho intenso, sem feriados nem domingos! Sem vocês não teria conseguido!!

Aos funcionários que marcaram minha chegada à Unesp: Neli, Ana, Marcelo, Van e Altamiro. Neli, obrigada por me abrir as portas da Unesp desde o primeiro dia que entrei em contato! Altamiro, obrigada pelos ensinamentos, tenho um novo olhar hoje com os cavalos. Ana, Van e Marcelo: obrigada pelos cafés com prosa!

Aos colegas e amigos da anestesia: Natache, Quel, Gauchinha (Carlize), Emir (Ademir), Anne, Pops, Carolita, Antônio, Chico, Romulito, Liiiiidia, Dri, Cravo, Guaiacs, Flavitcha, Motoca, Espertinha, Angie, Mariana, Miriely, Lu, Monica, obrigada pelos momentos de espairecer, pelas risadas na salinha, pela companhia para os baldes de café, pelo trabalho em equipe. Aos colegas da Unesp, obrigada pelos cafés roubados e pelas caipirinhas de final de semana: Marta, Murilo, Pablo, Lupe, Leandro e Alf.

Aos colegas da acupuntura: amiga Malu, mestre Jean, Tiziussss, Nicolssss, Celina, Dani e culega Nuno, obrigada pela boa energia que carrega minha bateria!

Caravana toda: minha família botucuda, vocês fazem toda a diferença no Brasil! Ao André e Tiziu amigos de corazón: obrigada por estarem sempre quando mais precisei.

Mi familia: Papá y Mamá: gracias por el apoyo constante e incondicional, por ustedes llegué hasta acá! A mis hermanas, gracias por estar siempre al lado, si ahí, a dos mil kilómetros, pero del lado izquierdo del pecho. A mis sobrinos Mateo, Emma, Manu, y Pipe, gracias por darme fuerza en los momentos de mayor cansancio. Tia Graciela y tio Bocho, esta va pa'ustedes que me bancan siempre y meten huevo junto conmigo!

À Fapesp, pelo apoio financeiro. Ao Brasil pelo recebimento.

RESUMO

CROSIGNANI, N. **Estudo Farmacocinético e Farmacodinâmico do cloridrato metadona por via oral, intramuscular e intravenosa e carreadores lipídicos nanoparticulados de metadona via oral em equinos**. 2013. 85f. Tese (doutorado) em Anestesiologia. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

Justificativa e Objetivo: Estudos para desenvolver técnicas mais aperfeiçoadas na abordagem da dor merecem atenção. As nanopartículas são carreadores de fármacos, que podem aumentar sua eficácia terapêutica e diminuir os efeitos adversos. Ao considerar a possível excitação causada pelo uso de opioides por via IV, objetivou-se estudar opções alternativas a esta via para administrar metadona em equinos. **Método:** seis éguas, de 2 a 4 anos, com peso médio de 354 ± 34 kg receberam com intervalo de sete dias e de forma aleatória 0,5 mg/kg de cloridrato de metadona O, IM e IV e nanopartículas lipídicas sólidas O. O avaliador não ciente do tratamento registrou a pressão arterial sistólica (PAS), a distancia do lábio inferior ao chão, as frequências cardíaca e respiratória, a motilidade intestinal e os limiares nociceptivos térmico, mecânico e elétrico durante 4 horas. Colheu-se sangue durante 6 horas para posterior análise da concentração plasmática de metadona por cromatografia de alta eficiência (CLAE). Avaliaram-se os perfis plasmáticos de metadona por abordagem não compartimental e compartimental. Analisou-se os dados paramétricos por modelos de medidas repetidas para avaliar diferenças entre os tratamentos e momentos. Usou-se o teste de Tukey para ajustar os valores-P resultantes das comparações múltiplas. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste Wilcoxon para comparar os tratamentos em cada momento e o de Bonferroni para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas ($p < 0,05$). **Resultados:** Em relação ao valor basal, nos animais tratados por via IV, a PAS aumentou por 80 minutos, os movimentos intestinais diminuíram entre 45 e 80 minutos e o limiar nociceptivo mecânico aumentou por 45 minutos. O limiar nociceptivo térmico aumentou em relação ao basal aos 60 e 80 minutos nos grupos IM e IV respectivamente e elétrico aumentou após o valor basal por 140 minutos após metadona IM e de 45 até 240 minutos após metadona IV. A metadona apresentou eliminação rápida ($0,92 \pm 0,32$ L/h/kg para IV) e meia vida curta ($0,63 \pm 0,11$ h para

IV) com tempo de retenção média (TRM) para a via IV de $0,97 \pm 0,17$ h. O modelo de um compartimento aberto, com eliminação de primeira ordem, descreveu adequadamente os dados plasmáticos após administração de metadona em todos os grupos. Escolheu-se o modelo com esquema de peso dois, por apresentar o melhor ajuste dos pontos. **Conclusões:** Independente da via de administração, a metadona apresenta um perfil farmacocinético de eliminação de primeira ordem e curta meia-vida, adaptando-se a um modelo de um compartimento. Tanto a metadona administrada por via oral na forma injetável de cloridrato e nanoparticulada, apresentam perfil farmacocinético similar, entretanto sem efeito antinociceptivo. A metadona administrada pelas vias IM e IV desencadeou efeito antinociceptivo predominantemente para estímulo térmico e elétrico. Dada à excitação, ativação simpática e hipomotilidade intestinal observadas apenas após administração de metadona IV, a via IM é aparentemente mais segura para a espécie equina.

Palavras chave: Metadona, cavalo, farmacocinética, nocicepção.

ABSTRACT

CROSIGNANI, N. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic study of orally, intramuscular and intravenous methadone hydrochloride and orally nanostructured lipid carriers of methadone in horses.** Botucatu, 2013. Doctorate in Anesthesiology. Medicine College of Botucatu. Paulista State University "Júlio de Mesquita Filho".

Introduction: Studies for the development of improved techniques for pain management deserve attention. Nanoparticles are carriers of drugs used to increase therapeutic efficacy and decrease adverse effects. Excitement is usually observed when opioids are administered intravenously. This study aimed to investigate new options, besides the intravenous route, for methadone administration in horses. The antinociceptive effect, physiologic parameters and pharmacokinetics (PK) were evaluated. Method: Six mares (354 ± 34 kg; 2 - 4 years) received 0.5 mg/kg of oral, intramuscular and intravenous methadone or orally methadone nanoparticles formulation prepared in-house, at one week interval. A blinded observer registered non invasive systolic arterial blood pressure (SAP), heart and respiratory rates, distance from the floor to animal's muzzle, intestinal motility, and mechanical, thermal and electrical nociceptive thresholds for four hours. Blood samples were collected for up to six hours for measurement of plasma methadone concentration. Methadone PK was evaluated by non-compartmental and compartmental modeling. Two way ANOVA followed by Tukey or Wilcoxon test was used to compare differences among groups, followed by Bonferroni correction for multiple comparisons ($P < 0.05$). Results: Compared to basal values, IV methadone increase SAP for 80 minutes, reduced intestinal motility between 45 and 80 minutes and increased mechanical threshold for 45 minutes. Thermal nociceptive thresholds increased for 60 and 80 minutes after IM and IV methadone and electrical nociceptive thresholds increased for 140 minute after IM methadone and from 45 to 240 minutes after IV methadone. After IV methadone, elimination was rapid (0.92 ± 0.32 L/h/kg for IV), half life was short (0.63 ± 0.11 h for IV) and mean retention time was $0.97 \pm .0.17$ h. One open compartmental model with first order elimination best described the plasma PK in all groups. Conclusions: Methadone PK profile was of first order elimination and based in one compartment model. Both O and NO methadone showed a similar PK profile,

but none produce antinociception. Thermal and electrical antinociception were observed after both IM and IV methadone, however considering that IV methadone produced excitement, sympathetic activation and reduced intestinal motility, IM methadone is apparently safer than IV methadone to be used in horses.

Key words: Methadone, horse, pharmacokinetic, nociception.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus célsius
$ASC_{0-\infty}$	área sob a curva do tempo zero ao infinito
ASC_{0-t}	área sob a curva do tempo zero ao tempo t
ASC_{ext}	área sob a curva extrapolada
$ASMC_{0-\infty}$	área sob a curva do primeiro momento
$ASMC_{0-\infty}$	área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao infinito
$ASMC_{0-t}$	área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao tempo t
$ASMC_{ext}$	área sob a curva no primeiro momento extrapolada
BHE	barreira hemato-encefálica
bpm	batimentos por minuto
C	concentração
C_0	concentração no tempo zero
Cl	depuração
CLAE	cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	carreador lipídico nanoestruturado
cm	centímetro
C_{max}	concentração máxima
D	dose administrada
Da	daltons
DP	desvio padrão
F	biodisponibilidade
f	frequência respiratória
FC	frequência cardíaca
GpP	glicoproteína P
H ₂ O	água

Hz	hertz
ILQ	inferior ao limite de quantificação
IM	intramuscular
IV	intravenoso
J	joules
ka	constante de absorção
ke	constante de eliminação
kg	kilograma
LNB	limiar nociceptivo basal
MDR1	gene de multirresistência às drogas
MeOH	metanol
mg	miligrama
mℓ	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
mpm	movimentos por minuto
ms	milisegundo
MSC	critério de seleção do modelo farmacocinético
N	Newtons
n	tamanho amostral
ng	nanaograma
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	nanoparticulada Oral
O	oral
PAS	pressão arterial Sistólica
rpm	rotações por minuto
SC	subcutânea
SNC	sistema nervoso central

$t_{1/2}$	meia-vida plasmática
$t_{\max}$	tempo para atingir $C_{\max}$
TRM	tempo de retenção médio
V	volts
Vd	volume de distribuição
λ	constante de velocidade de eliminação
μl	microlitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Farmacodinâmica e Farmacocinética	15
2.1.1 Farmacométrica	18
2.2 Opioides e analgesia em medicina veterinária.....	19
2.2.1 Limiares nociceptivos.....	20
2.3 Opioides e barreira hemato encefálica	21
2.4 Vias de administração	22
2.5 Nanopartículas	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Hipóteses e objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Preparação do carreador lipídico nanoestruturado com metadona	27
4.1.1 Obtenção de metadona sal a partir de cloridrato de metadona	27
4.1.2 Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN).....	27
4.2 Farmacocinética e farmacodinâmica da metadona nanoencapsulada e livre	28
4.3 Avaliação farmacocinética	30
4.4 Avaliação farmacodinâmica	33
4.5 Metodologia estatística.....	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Parâmetros farmacodinâmicos	39
5.2 Parâmetros farmacocinéticos	49
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO.....	71
8. REFERÊNCIAS.....	72
9 APÊNDICE	76

1. INTRODUÇÃO

A prevenção e terapêutica da dor apresentam importância clínica em seres humanos e em animais, pois a dor compromete diversas funções orgânicas. Embora se reconheça a importância de se tratar a dor nos dias atuais, estudos para o desenvolvimento de técnicas mais aperfeiçoadas e modernas na abordagem da dor merecem atenção. A morfina é tradicionalmente a base para o tratamento da dor e, embora eficiente, causa analgesia de curta duração e efeitos adversos em equinos (1), e estes poderiam ser minimizados por meio de novas técnicas de administração de fármacos do mesmo grupo.

Embora os opioides sejam considerados as substâncias analgésicas mais potentes para equinos, seu uso é limitado nesta espécie devido ao risco de efeitos adversos, como excitação, aumento da atividade locomotora e tônus muscular, hipomotilidade intestinal e estimulação cardiovascular. Estes efeitos vão ser influenciados pelo opioide utilizado, via de administração, dose e TRM do fármaco (2-4). Apesar do uso de opioide pela via epidural ser promissor para analgesia em equinos, este procedimento apresenta limitações técnicas, possibilidade de analgesia segmentar e necessidade de administração do agente por injeção no espaço epidural com riscos inerentes à via (5-7). Em seres humanos a administração oral de opioides apresenta uma boa relação custo-benefício, desta forma, esta via poderia ser uma alternativa efetiva a outras vias e também apresentar eficácia em equinos (8).

De forma diversa dos opioides agonistas totais, a metadona além de ser um agonista μ , é um antagonista de receptor N-metil D-aspartato (NMDA), e inibe a recaptação de norepinefrina, o que poderia contribuir para uma analgesia mais eficiente, tendo em vista que tem sido utilizada com sucesso em seres humanos com dor crônica refratária ao uso de morfina (9).

As nanopartículas tem atraído intenso interesse nos últimos anos, pois esses sistemas podem prover vetorização de forma sustentada, controlada e atuar como carreadores de fármacos, o que aumenta a eficácia terapêutica e diminui os efeitos adversos (10). O tratamento da dor com o uso de opioides em equinos tem apresentado limitações pela curta meia-vida quando administrados por via parenteral, assim como pelos efeitos colaterais. Uma formulação que permita o

efeito terapêutico com menor quantidade de metadona pode, potencialmente, pelo fato de utilizar doses menores, diminuir o custo do tratamento antálgico nos equinos, com uma possível maior eficácia analgésica e menores efeitos adversos, como aumento da atividade locomotora, excitação do SNC e simpático e hipomotilidade intestinal. Desta forma, a hipótese geral deste estudo foi que metadona sob a forma nanoencapsulada promoveria analgesia com doses menores de fármaco e consequentemente com menor risco de efeitos adversos, além de um efeito mais prolongado. Também se propôs a investigar uma alternativa à via intravenosa pelo estudo da via intramuscular, no intuito de diminuir os efeitos adversos do fármaco mantendo o efeito analgésico. Neste contexto, este estudo pretende avaliar a farmacodinâmica e farmacocinética do tratamento com metadona em nanocápsulas por via oral em equinos, assim como do cloridrato de metadona por vias oral, intramuscular e intravenosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os opioides são fármacos que atuam em receptores opioides e, por conseguinte, induzem a uma analgesia intensa, acompanhada de efeitos adversos significativos. A partir desta premissa, procurou-se desenvolver congêneres sintéticos potentes com menos efeitos colaterais, quando sintetizou-se agonistas totais e parciais, agonistas/antagonistas e até mesmo antagonistas opioides no sentido de estender as opções terapêuticas (11).

Diante do exposto em epígrafe, pode-se afirmar que a metadona é um opioide sintético agonista μ , que foi sintetizado em 1943 pelos alemães, durante a segunda guerra mundial, como alternativa ao uso de morfina. Além de ser um agonista μ , atua como antagonista de receptores NMDA, bem como inibe a recaptação da serotonina e norepinefrina no SNC (9, 12-15). É comercializada como uma mistura racêmica de dois enantiômeros: as formas R e S. A primeira forma possui potência e afinidade com receptores opioides dez vezes maior do que a segunda; a forma S é responsável pela ação nos receptores NMDA, serotonina e norepinefrina (9). 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 (16, 17). Além do efeito benéfico da analgesia, são descritos em humanos efeitos indesejáveis como euforia, depressão respiratória e arritmias cardíacas (18, 19).

A metadona apresenta pH alcalino e pKa de 9,2, é lipofílica e possui alta ligação às proteínas plasmáticas inclusive a albumina, lipoproteínas e glicoproteínas (20). Seu TRM em equinos submetidos a 0,4 mg/kg foi de 122,4 min, o que é considerado curto quando se pretende um tratamento antálgico pós-cirúrgico prolongado (8). Este fármaco possui características que contribuem com uma alta solubilidade e permeabilidade, como peso molecular baixo (< 500 Da) e alta lipossolubilidade (21).

2.1 Farmacodinâmica e Farmacocinética

Farmacodinâmica é a ciência que estuda a ação de um fármaco sobre o organismo, microrganismos ou parasitas. Utiliza modelos tanto *in vitro* (células ou tecidos), *ex vivo* (tecidos ou células previamente expostos a um fármaco no animal),

como *in vivo* (medindo o efeito antinociceptivo de um analgésico), podendo empregar uma grande gama de metodologias (22).

Farmacocinética é a ciência que estuda a cinética da absorção da droga, distribuição e eliminação (metabolismo e excreção). A descrição sobre a distribuição e eliminação geralmente é denominada disposição do fármaco. O estudo da farmacocinética envolve aproximações experimentais (técnicas de amostragem, métodos analíticos para a mensuração de concentrações plasmáticas) e teóricas (modelos farmacocinéticos para prever a disposição do fármaco após sua administração) (23).

Em uma análise não compartimental dos dados é feita a descrição das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, começando com o cálculo da área sob a curva, e a estimação do final da mesma (inclinação). Neste tipo de análise, não se assumem formas na curva. A área sob a curva (ASC_{0-t}) pode ser calculada pela soma dos trapezoides (linear ou logarítmica), tomando os valores entre o tempo zero e o último tempo. Para ter a concentração no tempo zero (C_0), extrapolamos o logaritmo da concentração ao longo do tempo até o tempo zero. O logaritmo extrapolado até o eixo do tempo dará o valor da área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}), que somada à ASC_{0-t} é denominada $ASC_{0-\infty}$ (24).

Dentre os parâmetros farmacocinéticos que podem ser estudados, a depuração é um dos que têm maior relevância, já que este será o que determinará a exposição total do paciente ao fármaco e a dosagem a ser utilizada para manter a concentração plasmática dentro da janela terapêutica (junto com a concentração plasmática terapêutica, se a administração for extravascular, a biodisponibilidade). Irá medir a habilidade total do organismo para eliminar o fármaco, utilizando-se de modo geral o termo depuração plasmática, já que o plasma é a matriz mais comumente utilizada para medir as concentrações circulantes do fármaco (25). Define-se a depuração plasmática como a relação entre a taxa de eliminação do fármaco e a concentração plasmática do fármaco, que vem a suprir o processo eliminatório. Matematicamente é a razão da dose com a $ASC_{0-\infty}$ (24).

Se pensarmos em uma interpretação fisiológica da depuração, devemos considerá-la como uma relação entre a quantidade de fármaco que é eliminado durante a passagem pelo órgão de eliminação (no caso da metadona, fígado com principal via de eliminação nas fezes) e o débito cardíaco. (9, 25).

Meia-vida plasmática é o tempo necessário para diminuir a concentração no plasma do fármaco pela metade após alcançar um pseudoequilíbrio. Para seu cálculo se utiliza o valor da inclinação final da curva, que expressa quanto do fármaco é eliminado por hora. Meia-vida é um parâmetro dependente de variáveis fisiológicas, como extensão do volume de distribuição e a somatória da depuração de vários órgãos (fígado, rim, e outros, como pulmão), os quais por sua vez dependem de outros fatores (como perfusão tecidual, fração livre em plasma, afinidade do fármaco pelo sistema enzimático e pelas proteínas plasmáticas, volume plasmático). Ao depender destas variáveis, se categoriza a meia-vida como um parâmetro farmacocinético híbrido, o que faz dela um parâmetro pobre para avaliar a influência de parâmetros fisiológicos ou patológicos na disposição dos fármacos (26). Um exemplo disto poderia ser o acontecido na pesquisa de Riviere *et al.* (27). Nesta, estudaram a farmacocinética da gentamicina em equinos antes e após nefrotoxicidade, e os equinos afetados tiveram uma diminuição na depuração de 40%. No entanto, a meia-vida permaneceu inalterada, pois o volume de distribuição diminuiu na mesma proporção. A importância do cálculo do tempo de meia-vida reside em poder determinar a persistência do fármaco no organismo na fase terminal – o que será importante para indicar os intervalos para a administração de uma medicação em um paciente –, e, se pensarmos em um regime multidose, em prevenir uma possível acumulação (26).

Para expressar o tempo de persistência do fármaco no organismo é melhor utilizar outro parâmetro farmacocinético, o TRM. Seu cálculo é feito com a relação entre $ASC_{0-\infty}$ e $ASMC_{0-\infty}$, e expressa o tempo em que uma molécula do fármaco permanece no organismo (23).

O volume aparente de distribuição expressa a relação entre a quantidade de uma droga no organismo e a concentração plasmática em um momento determinado. Este parâmetro farmacocinético vai determinar a dose a ser utilizada de um fármaco, assim como a meia-vida (a maior V_d , maior será a meia-vida) (28). Para seu cálculo iremos utilizar a dose administrada dividida sob o valor da C_0 , utilizando os parâmetros da área sob a curva em tempo zero e a extrapolada (24).

Quando o fármaco é administrado por via extravascular, ocorre um processo de absorção antes que a droga atinja a circulação sistêmica, o qual vai depender das propriedades farmacêuticas do produto assim como da via de administração.

Este processo pode ser quantificado pelo parâmetro de biodisponibilidade (F), e é geralmente expresso em porcentagem. Devemos distingui-lo do termo absorção, já que, por exemplo, um fármaco pode ter 100% de absorção e uma baixa disponibilidade a causa de uma metabolização pulmonar rápida, como é o caso da $\text{PgF2}\alpha$, a qual apresenta 90% de metabolização pulmonar (29). Estratégias para aumentar a biodisponibilidade de um fármaco são novas vias de administração e formulação com maior penetração.

2.1.1 Farmacométrica

Farmacometria é a ciência que desenvolve e aplica modelos matemáticos e estatísticos para biologia, farmacologia, doenças e fisiologia no intuito de descrever, compreender e quantificar as interações entre xenobióticos e animais (30).

Ao longo da história a medicina veterinária tem investigado os dados farmacodinâmicos e farmacocinéticos de forma não integrada, já que, na maior parte dos estudos, primeiro se determina a dosagem para posteriormente realizar o estudo clínico do fármaco, e às vezes não se registram estudos farmacocinéticos para os fármacos utilizados (31, 32).

Em trabalhos em que se pesquisa a farmacodinâmica do fármaco, teremos somente o dado da massa administrada (mg/kg), e em estudos com farmacocinética e farmacodinâmica, estudaremos o perfil de concentração no tempo, ou seja, tanto os efeitos da dose administrada como a influência do animal sobre o fármaco (depuração, distribuição, etc.).

A análise não compartimental dos dados é mais fácil de executar e menos subjetiva, o que leva a ter resultados mais robustos que na análise compartimental. No entanto, informa pouco sobre a disposição do fármaco e pouco se pode prever dos seus dados, mas é o passo prévio para uma posterior análise compartimental dos dados (23, 30).

Um modelo farmacocinético basicamente é uma equação determinada por parâmetros em que se escolhe aquela que melhor se adapta aos dados, e que vai prever o perfil das concentrações plasmáticas (urina, fezes, líquido cefalorraquidiano, etc.) ao longo do tempo. A equação escolhida poderá ser ajustada para prever diferentes condições, como diferentes doses, efeitos de tratamentos multidoses e

diferentes vias de administração. Entre as desvantagens dos modelos farmacocinéticos se incluem a complexidade inerente, as assunções que o pesquisador faz sobre o modelo para a escolha do mesmo, como sobre a forma da curva, o que leva à possibilidade de falha para encontrar a melhor solução para o modelo. Devido a isso, para poder fazer uma boa modelagem, é essencial a boa escolha dos pontos a serem coletados no delineamento experimental, calculando a quantidade de amostras, o tempo da primeira colheita e do último ponto (30).

Após uma injeção em bolus, podemos predizer a relação da concentração ao longo do tempo em modelos de um, dois ou três compartimentos. Quanto maior for o número de compartimentos aos que se adapte o modelo, mais valores serão estimados, levando à diminuição do poder estatístico dos dados, já que a quantidade de dados para as assunções não muda. Por isso, deve-se escolher sempre o modelo mais simples que se adapte aos dados (23, 30).

Bioequivalência se refere ao estudo do efeito de um fármaco, quando comparado um produto em teste com um segundo fármaco de referência. Estes testes podem ser feitos tanto em forma *in vitro* como *in vivo* (23).

2.2 Opioides e analgesia em medicina veterinária

O uso de analgésicos opioides em cavalos é justificado quando os benefícios da analgesia são maiores que os possíveis efeitos adversos. No entanto, condições experimentais demonstraram que a ação analgésica dos opioides pela via parenteral nesta espécie ainda não está bem definida. Resultados inconsistentes do efeito antinociceptivo de opioides podem advir da variabilidade individual entre os animais usados nos estudos, da inconsistência dos efeitos dos fármacos usados, ou das falhas nos modelos de dor adotados (2).

Reporta-se que a administração sistêmica de opioides em cavalos tem o potencial de produzir excitação do SNC em contraste com a sedação no homem e no cão, o que limita o uso deste grupo farmacológico nesta espécie por parte dos médicos veterinários. Tanto a excitação do SNC como do sistema nervoso simpático têm sido citadas com diferentes opioides derivados da morfina. Doses que produzem analgesia cutânea no cavalo aumentam a frequência cardíaca e respiratória,

produzem midríase e hipertermia, além de aumentarem a atividade locomotora espontânea (33).

Os opioides agonistas como a morfina e o fentanila aumentam a atividade dopaminérgica da substância *nigra* e do centro de atividade locomotora no SNC, que pode ser reduzida com um antagonista de receptor dopaminérgico como a acepromazina (33).

Em pesquisa, Figueiredo *et al.* (3) injetaram via intramuscular e intravenosa morfina em 6 equinos, no entanto não observaram aumento no limiar nociceptivo térmico ou elétrico nas doses de 0,05 e 0,1 mg/kg.

A administração espinal de opioides, comparada ao uso IM ou IV, apresenta vantagens como efeito prolongado e redução na incidência de excitação ou na severidade da sedação (5, 6, 34).

A injeção subaracnoide de 0,01 mg/kg de morfina ou metadona hiperbáricas produz intensa analgesia por um período de 120 minutos nos dermatômos das regiões perineal, sacral, lombar e torácica, sem induzir efeitos de depressão cardiorrespiratória, ataxia ou excitação do SNC em cavalos (34).

2.2.1 Limiares nociceptivos

Para o estudo de limiares nociceptivos são aplicados estímulos quantificáveis em uma parte do organismo até que uma resposta fisiológica seja observada, ponto em que a aplicação do estímulo é interrompida. Podem ser utilizados experimentalmente para estudar a eficácia analgésica de analgésicos: um aumento do limiar nociceptivo é interpretado como efeito antinociceptivo por parte do fármaco (35).

Um modelo para estudo de limiares nociceptivos deve manter determinados critérios, como ser identificável, qualitativamente similar entre indivíduos, estável durante o tempo e reproduzível. Não deve produzir danos teciduais nem estados de hiperalgesia, sendo efetivo em detectar efeitos antinociceptivos dos fármacos estudados (3, 35).

Os limiares térmicos podem ser aplicados em uma temperatura constante e medir o tempo que o animal se demora em retirar o membro, ou avaliar em uma

temperatura em rampa, a qual valor em °C o animal reage. Em equinos tem-se utilizado um aquecimento lento quando é utilizado o método de estímulo em rampa, o que estimula fibras do tipo C (35).

Estímulos mecânicos podem ser aplicados mediante dispositivos pneumáticos, que irão aplicar uma força sobre uma área da pele, registrando em unidades de força, como joules, o valor que o equipamento aplicou para que o animal tenha o reflexo de retirada do membro. A região dorsal dos metacarpianos nos cavalos tem pouca variação anatômica entre indivíduos, por isso tem preferência para a aplicação do estímulo mecânico nesta espécie (35).

Limiares nociceptivos elétricos são um método efetivo para estudar efeitos farmacológicos de analgésicos em equinos. Já foi utilizado tanto para opioides como para outras família de fármacos, como os agonistas de receptores $\alpha 2$ (3, 12).

2.3 Opioides e barreira hemato encefálica

Para ultrapassar as barreiras biológicas e chegar ao tecido alvo, os analgésicos de ação central e outros xenobióticos biologicamente ativos compartilham a característica comum de lipossolubilidade e se apresentam, na maioria das ocasiões, ionizados no pH fisiológico. A maior parte dos fármacos e de seus metabólitos penetra as células por difusão passiva, no entanto, alguns fármacos são difundidos 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 multirresistência a múltiplas drogas (*MDR1*), é uma proteína transmembrana que atua exportando ativamente substratos do espaço intracelular para o extracelular ((36-38). A função da GpP é a de reduzir o acúmulo intracelular de xenobióticos mediante efluxo ativo, para diminuir a concentração efetiva do fármaco no tecido alvo (36). 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 SNC (39).

Vários são os substratos da GpP em medicina veterinária e muitos permanecem inexplorados. Entre eles encontram-se alguns agentes terapêuticos,

tais como antagonistas de receptores H₂ da histamina (cimetidina, ranitidina), antagonistas de receptor β -adrenérgico (reserpina), immunosupresores (ciclosporina A), antibióticos (tetraciclina, rifampicina, levofloxacina), antieméticos (ondasentrona), agentes antitumorais (doxorubicina, vincristina), bloqueadores dos canais de cálcio (verapamil, diltiazem), antiarrítmicos (digotoxina, digoxina), antagonistas de receptor H₁ (fexofenadina, terfenadina), opioides (morfina, metadona, fentanila), esteróides (dexametasona, metilprednisolona), e outros (fenotiazinas, ivermectina, vecurônio, amitriptilina). Por outro lado, alguns fármacos são inibidores da GpP, por exemplo, o verapamil, a quinidina, a ciclosporina e o cetoconazol, entre outros (37, 38).

2.4 Vias de administração

As vias oral, retal, intravenosa (IV), IM e subcutânea (SC) podem ser utilizadas para a administração de metadona, entretanto a última não é recomendada em medicina humana pela alta frequência de reações adversas locais (18).

A aplicação de opioides por via epidural e subaracnóidea tem sido amplamente usada em medicina veterinária, com o propósito de evitar os efeitos indesejáveis observados quando administrados por outras vias (5). A metadona injetada por via extradural apresenta um início de ação rápido, causando menor depressão respiratória em cães quando comparada à via IV na dose de 0,3 mg/kg (40). Estes autores observaram que durante a cirurgia o requerimento de isoflurano foi significativamente menor no grupo que usou a metadona extradural.

A Organização Mundial da Saúde indica a via oral como via de administração preferencial de medicamentos devido à segurança, não invasibilidade, custo, praticidade e efetividade (41). A administração sublingual de opioides proporciona uma absorção rápida pela mucosa oral, o que evita o metabolismo hepático de primeira passagem. No homem, a cavidade oral oferece uma plêiade de locais para absorção de fármacos: a mucosa bucal, gengival e sublingual, sendo a última a região mais permeável pela menor espessura, alta irrigação e por não ser queratinizada (41, 42). Dentre os fatores que influenciam a absorção transmucosa de um fármaco, o mais importante é a característica lipofílica, que é 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 (41, 42).

Linardi *et al.* (8) 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 quando comparado com humanos. Porém foi observada variabilidade entre os animais nos parâmetros farmacocinéticos e uma curta meia-vida de 1,5 h para a maior dose (8, 43). Em cães a meia-vida também é curta (1,75 h) com alta depuração, no entanto, a biodisponibilidade via oral é pobre (44).

Little *et al.* (45) compararam em cães a administração de fentanila por via gengival em uma preparação com carboximetilcelulose, com a via IV, e observaram que os animais apresentaram níveis séricos detectáveis pela via transmucosa após 5 minutos, sem diferenças farmacocinéticas entre os grupos, a não ser por um tempo maior na detecção sérica de fentanila em níveis terapêuticos, quando administrado na forma de gel, mas sem aumento no TRM.

Compostos bioadesivos de fentanila foram testados *ex vivo* em membrana esofágica suína, e os resultados demonstraram que esta é também uma possível via de administração (46).

2.5 Nanopartículas

O SNC se apresenta como um desafio particular pelos vários obstáculos que impedem os fármacos de atingir o tecido cerebral e medular (47). O SNC possui capilares estruturalmente diferentes dos capilares em outros tecidos, e tais diferenças resultam em uma barreira para a permeabilidade entre o sangue e o fluido extracelular cerebral e medular. Em vertebrados os capilares do cérebro e medula bloqueiam os pequenos poros que permitem o movimento rápido de solutos desde a circulação. Estes capilares estão alinhados com uma capa especial de células endoteliais que obstruem as fenestrações e possuem junções estreitas (*tight junctions*). Esta barreira que compromete a permeabilidade nos capilares centrais é conhecida como barreira hematoencefálica. Algumas regiões do SNC não possuem

a barreira hematoencefálica clássica, e em seu lugar apresentam microvasos similares aos periféricos, os quais são mais permeáveis aos solutos. Estas regiões são adjacentes aos ventrículos cerebrais e órgãos circunventriculares (47).

A nanobiotecnologia, do grego nano (anão), relacionado ao fator 10^{-9} , refere-se à fusão de duas abordagens tecnológicas recentes, a biotecnologia e a nanotecnologia, apresentando enormes inovações e potencialidades. A nanobiotecnologia é definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos (nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais) nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. Áreas importantes da nanobiotecnologia incluem a nanomedicina (biologia molecular e genética), a física média (diagnóstico) e o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados).

As nanopartículas apresentam uma nova opção como carreadores terapêuticos quando se objetiva atingir o SNC, por reforçar a eficácia e reduzir os efeitos adversos de uma grande variedade de fármacos. Elas medem de 10 a 1000 nm e levam na sua superfície fármacos que atravessam a barreira hematoencefálica por endocitose e atingem o SNC. O termo nanopartículas refere-se a dois tipos de estruturas, as nanoesferas e as nanocápsulas, as quais se distinguem por possuir ou não um núcleo diferenciado. As nanocápsulas são formadas por um núcleo, que pode ser sólido ou líquido, e a substância encontra-se isolada do meio externo por uma membrana (48). De modo geral, estes sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial, são considerados vetores para a administração de substâncias lipofílicas, possibilitam uma liberação homogênea e, muitas vezes, controlada de fármacos e aumentam a resposta terapêutica no local de ação por tempo prolongado (10).

As nanopartículas lipídicas sólidas se mostram como uma alternativa interessante às nanopartículas produzidas com outros materiais (como as poliméricas), já que os lipídeos, em linhas gerais, são bem tolerados pelo paciente, podem ser produzidas em grande escala com um custo conveniente e de uma forma simples, utilizando homogeneização de alta pressão (49).

No final dos anos 90, surgiu um novo tipo de nanopartículas lipídicas sólidas, os carreadores lipídicos nanoestruturados. Eles melhoraram a eficiência de encapsulamento do fármaco pela distinta disposição dos lipídeos utilizados (50).

Para obter-se carreadores lipídicos nanoestruturados podem utilizar-se vários processos, um deles o de homogeneização a quente. Consiste em aumentar a temperatura da fase lipídica acima do seu ponto de fusão, para dispersá-la na fase aquosa pré-aquecida à mesma temperatura, contendo o tensoativo. Por meio de agitação a alta velocidade é produzida uma pré-emulsão, a qual é homogeneizada à alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade de poucos micrômetros, que formará nanopartículas pela colisão (49, 50).

Alyautdin *et al.* (51) compararam em camundongos a formulação de loperamida nanoparticulada com o composto livre e observaram que a primeira opção terapêutica foi a única que atingiu o SNC e permaneceu no local por 24 horas, promovendo também efeito antinociceptivo, não observado com a formulação livre.

Betbeder *et al.* (52) observaram que a administração intranasal de morfina nanoparticulada em camundongos, proporcionou analgesia mais prolongada e com menores doses, revertida pela administração de naloxona.

Wang *et al.* manipularam duas formulações de nanopartículas para a buprenorfina injetável em camundongo, obtendo efeito antinociceptivo por oito horas com nanopartículas de fase sólida, sendo que a emulsão lipídica da droga mostrou este efeito por somente 3 horas (53).

Na literatura consultada não se encontraram dados referentes à metadona nanoparticulada. Tal sistema de disponibilidade oral de metadona nanoparticulada incorpora novas tecnologias para o transporte, tanto por transmucosa oral, como através da barreira hematoencefálica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antinociceptivo e perfil farmacocinético de uma formulação nanoparticulada de metadona administrada por via oral em equinos e investigar a via IM como alternativa à IV para o uso da metadona em equinos.

3.2 Hipóteses e objetivos específicos

Hipótese 1

A metadona NO apresenta maior absorção oral, TRM e passagem pela barreira hematoencefálica, em relação a metadona O e, por conseguinte, maior efeito antinociceptivo.

Objetivo 1

Estudar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico da metadona NO, da metadona livre O e IV.

Hipótese 2

A metadona IM causa efeito antinociceptivo comparável e menos efeitos cardiovasculares e gastrointestinais adversos em relação à via IV.

Objetivo 2

Estudar e comparar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico da metadona IM e IV.

4. MATERIAL E MÉTODO

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica aprovou este projeto sob o protocolo 55/2011.

4.1 Preparação do carreador lipídico nanoestruturado com metadona

4.1.1 Obtenção de metadona sal a partir de cloridrato de metadona

Solubilizou-se o cloridrato de metadona (Cristália[®]) em água e adicionou-se carbonato de sódio em excesso, sob agitação magnética. Manteve-se a agitação durante 1 hora, o que resultou em uma suspensão de partículas brancas. Extraíu-se a suspensão com acetato de etila em funil de decantação e este foi evaporado em baixa pressão e rotação. O produto resultante foi um cristal branco que foi avaliado por espectrometria infravermelho (FT – IR SPECTRUM BX, Perkinelmer[®]). O rendimento foi superior a 80%.

4.1.2 Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN)

As dispersões aquosas de CLN foram preparadas segundo metodologia adaptada descrita por Müller e colaboradores (2000). A manteiga de coco (Cosmetrate[®]), manteiga de cupuaçu (Cosmetrate[®]) e Span 80 (Sigma[®]) e metadona base foram dissolvidos em banho-maria na temperatura 37°C. A mistura foi dispersa sob alta agitação (5 min) usando um Ultra-Turrax (T25, Ika[®]) em uma solução aquosa (água MiliQ[®]) contendo Tween 80 (Sigma[®]), mantida a mesma temperatura da fase lipídica (tabela 1). A pré-emulsão obtida foi homogeneizada a alta pressão (Panda 2K NS1001L, Niro Saovi[®]) aplicando-se 5 ciclos de 300 bar.

Tabela 1 - Componentes utilizados nas fases orgânica ou lipídica e aquosa para preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN).

Componentes	Formulações	
	CLN-Branco	CLN-metadona
Fase Orgânica ou Lipídica		
Manteiga de coco	5 g	5 g
Manteiga de cupuaçu	5 g	5 g
Span 80	3 g	3 g
Metadona base	-	0,6 g
Fase Aquosa		
Água MilliQ (q.s.p)	200 ml	200 ml
Tween 80	1,54g	1,54g

Preparação do gel

Depois de preparadas as dispersões aquosas de CLN, adicionou-se 0,5% de carboximetilcelulose e a mistura foi homogeneizada sob alta agitação (2 min) usando um Ultra-Turrax (T25, Ika).

Caracterização físico-química da formulação: Difratometria a LASER

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula (Span) foram determinados por difratometria a LASER (Malvern Mastersizer®) (49). O Span é definido pela equação:

$$Span = \frac{D(90) - D(10)}{D(50)}$$

onde $D_{(10)}$, $D_{(50)}$ e $D_{(90)}$ representam os diâmetros cumulativos das partículas de 10 %, 50 % e 90 %, respectivamente. Utilizou-se essa técnica pela capacidade de analisar uma ampla faixa de tamanhos e verificar a presença de partículas micrométricas.

4.2 Farmacocinética e farmacodinâmica da metadona nanoencapsulada e livre

Animais – Determinou-se o tamanho amostral de seis animais por grupo de acordo com a diferença média esperada entre os grupos, para a área sob a curva

em torno de 7100 ng, com desvio-padrão igual a 6000 ng, poder do teste de 80% e nível de 5% de significância. A seleção dos equinos se baseou em exames clínico, laboratorial (hemograma, perfil bioquímico – ureia e creatinina, perfil hepático – TGO e GGT) e comportamental (animais calmos, que aceitassem os equipamentos sem ansiedade durante o período de treinamento). As éguas foram treinadas durante um mês para se acostumarem com o ambiente, os pesquisadores e os equipamentos. Selecionaram-se seis éguas, entre dois e quatro anos, com peso de 354 ± 34 kg.

Delineamento experimental – Os animais participaram de quatro sessões de trabalho, cada uma correspondendo a um grupo experimental. Cada animal recebeu um dos quatro diferentes tratamentos por via IV, IM ou O, com intervalo mínimo de uma semana entre cada tratamento mediante sorteio aleatório:

- ✓ NO: 0,5 mg/Kg de metadona nanoencapsulada por via oral;
- ✓ O: 0,5 mg/Kg de cloridrato metadona (Cristália[®]) por via oral, diluída em carboximetilcelulose;
- ✓ IV: 0,5 mg/kg de cloridrato metadona (Cristália[®]) via intravenosa jugular direita;
- ✓ IM: 0,5 mg/kg de cloridrato metadona (Cristália[®]) por via intramuscular na região cervical.

Colheram-se amostras de sangue (8mℓ) para farmacocinética em tempos determinados pelo perfil farmacocinético de Linardi *et al.* (8), como base no tempo total 4,5 meias-vidas. Os tempos foram em minutos: 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360. Para cada tempo de colheita sanguínea, descartavam-se os primeiros 5 mℓ de sangue retirados do cateter.

Realizou-se tricotomia nas regiões das veias jugular direita e esquerda e antissepsia com álcool iodado. Na veia jugular esquerda introduziu-se um cateter 14G (Mila[®]) para colheita das amostras sanguíneas e introduziu-se outro cateter na jugular direita (BD[®]), por onde realizou-se a administração dos fármacos do grupo IV. Centrifugou-se o sangue colhido em tubos com anticoagulante (BD[®]) e congelou-se o plasma em duas alíquotas para cada momento a -70°C, até o processamento. Aferiu-se o pH oral dos equinos (Merck[®]).

4.3 Avaliação farmacocinética

Para avaliar o perfil farmacocinético das concentrações plasmáticas de metadona, mediante análise não compartimental e compartimental, utilizaram-se os programas Excel[®] 2003 (Microsoft[®]) e Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]), respectivamente.

Metodologia Analítica

Todas as amostras foram processadas no Centro Bioanalítico de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade do Rio Grande do Sul. Realizou-se a metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrita por Musshoff *et al.* (54) e validada por Kukanich *et al.* (55), com um cromatógrafo líquido de alta performance (Shimadzu[®], USA), em *tandem* com espectrômetro de massas Quatro LC Micromass[®] (Waters Corportaion, USA).

Utilizou-se a coluna cromatográfica C8 de 3 x 150 mm, 5 µm (XDB-C8 Agilent[®] Eclipse) e pré-coluna Agilent C8. A fase móvel foi composta por 70:30 de MeOH:H₂O (Omnisolv[®]) e ácido fórmico 0,1% (Merck[®]), com de 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.

Usou-se o espectrômetro de massas no modo eletrospray positivo de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros do espectrômetro de massas para detecção de metadona em plasma de equinos, usando-se o fentanila 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
Fentanila (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 fentanila, m/z 337,1 a 188.

Preparação das amostras para injeção

Submeteram-se as amostras de 100 µl de plasma com 10 µL de solução de padrão interno (Fentanil, 200 ng/mL, Cristália[®]) ao processamento de precipitação de proteínas com adição de 1,2 mL de acetato de etila (Nuclear[®]) e mistura no agitador de tubos por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4 °C (MR-23, Jouan[®]) por 10 min, colocadas a -80 °C por 5 minutos ou até o congelamento do precipitado, para transferência do sobrenadante para tubos de centrifuga à vácuo (RC 10.10 – RCT 90, Jouan[®]). Evaporou-se o conteúdo dos tubos (2 horas), para finalmente ressuspender em 100 µL de MeOH:H₂O. As amostras foram injetadas no LC-MS/MS no volume de 20 µL.

Calibração

Realizaram-se curvas de calibração intradia. A metodologia foi validada em plasma, contemplando a faixa de concentração de 5 a 1000 ng/mL (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL) com controles de qualidade de 7.5, 375 e 750 ng/mL. A validação parcial compreendeu três curvas injetadas consecutivamente, avaliando-se linearidade e limite inferior de quantificação.

Avaliação não compartimental do perfil plasmático da metadona

Avaliou-se os perfis plasmáticos de metadona por abordagem não compartimental e determinou-se os parâmetros de biodisponibilidade absoluta, depuração, tempo de meia-vida, volume de distribuição e tempo de residência médio, a partir das equações listadas abaixo (24).

Calculou-se a constante de velocidade de eliminação (λ) 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 , determinou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da metadona pela equação 1:

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

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

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

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

Estimou-se a depuração pela equação 4, em que D é a dose administrada.

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

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

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

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

Calculou-se o tempo de residência médio (TRM) 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 IV e $ASC_{0-\infty}$ IV.

Análise compartimental do perfil sérico da metadona

A análise compartimental baseou-se no modelo farmacocinético que mais se ajustou aos dados experimentais. Avaliou-se a qualidade da modelagem pelo ajuste visual do perfil das curvas dos modelos empregados, comparado aos pontos experimentais referentes à escala logarítmica das concentrações plasmáticas ao longo do tempo, adicionado de ajustes que utilizam o coeficiente de correlação (r) e o 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.

4.4 Avaliação farmacodinâmica

Estudaram-se os seguintes parâmetros farmacodinâmicos sempre na mesma ordem pelo avaliador não ciente do tratamento, em sequência: distância do lábio inferior ao chão, pressão arterial não invasiva (Doppler), motilidade intestinal por escores de auscultação, frequência cardíaca e respiratória e limiares nociceptivo após estímulo térmico, mecânico e elétrico.

Para a avaliação nociceptiva considerou-se o reflexo de retirada do membro após o estímulo. Para determinar os valores nociceptivos basais intradia, antes da administração de qualquer tratamento, realizaram-se três mensurações com intervalo de 10 minutos entre cada uma. Considerou-se o valor intermediário como limiar nociceptivo basal (LNB). Os tempos para as avaliações nociceptivas e fisiológicas foram 0, 10, 20, 45, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 210 e 240 minutos.

A avaliação do reflexo de retirada do membro após o estímulo elétrico foi realizada por estimulador de nervos de corrente contínua (GRASS S-48, Astro-Med[®]), por meio de dois eletrodos adesivos colocados a oito cm de distância, sobre a banda coronária do membro torácico esquerdo (Figura 1). Para tal realizou-se previamente tricotomia e limpeza com água e sabão da região, secou-se a mesma e aplicou-se álcool, no intuito de eliminar sujidades que interferissem com a impedância da pele.

O estímulo elétrico seriado iniciou-se com 1 V e incrementou-se 1 V para cada 5 segundos, até o reflexo de retirada. Utilizou-se corrente alternada, quadrada, de 50 Hz e 10 ms de duração, de forma crescente. As respostas nociceptivas foram consideradas positivas após movimentos intencionais de retirada dos membros

frente ao estímulo. Para evitar dano tissular, o estímulo máximo aplicado limitou-se a 20 V. Antes do início do estudo testou-se o estimulador elétrico para garantir que as características selecionadas para a onda fossem conduzidas até os eletrodos adesivos.



Figura 1 - Demonstração do posicionamento dos eletrodos adesivos na banda coronária do membro torácico esquerdo dos equinos.

A estimulação nociceptiva de natureza térmica e mecânica foi realizada com equipamentos produzidos pela empresa Topcat Metrology Ltd[®]. Para o estímulo térmico foi utilizado um equipamento sem fio, que possui um dispositivo que aumenta a temperatura local e é registrada no visor digital. Desta forma registrou-se tanto a temperatura inicial da pele, como a temperatura de retirada do membro por parte do animal (°C), considerando-se a diferença entre ambas para a avaliação nociceptiva térmica. O dispositivo foi colocado no metacarpo direito do animal e foi trocado de lugar, da região distal a proximal a cada três estímulos, ou quando se atingia o valor máximo de 60°C, a fim de evitar queimaduras dérmicas.

Avaliou-se o estímulo mecânico na superfície da pele do metacarpo esquerdo por meio de um dispositivo de ação pneumática, que exerceu pressão por meio de um pino com superfície de 1 mm a uma velocidade de 0,8 N/s. O ponto de corte foi 20 N para evitar danos tissulares.



Figura 2 - Equipamentos para estímulo nociceptivo térmico (metacarpo direito) e mecânico (metacarpo esquerdo) posicionados em um cavalo.

Os escores de auscultação abdominal foram obtidos por estetoscopia abdominal segundo Teixeira Neto *et al.* (56, 57). Dividiu-se o flanco lateral direito em duas porções e avaliou-se a abertura da válvula ileocecal na fossa paralombar (porção dorsal) e no cólon ventral direito, próximo ao rebordo das últimas três costelas. No flanco esquerdo, avaliou-se a motilidade do cólon dorsal, na porção caudal da fossa paralombar e o cólon ventral, na porção ventral do abdome.

Auscultou-se cada quadrante por um minuto, com um intervalo de poucos segundos entre eles. Uma pontuação subjetiva foi designada para cada quadrante: 0-ausência de som; 1-sons tipo crepitação, pouco audíveis e abafados, com frequência de uma vez por minuto; 2- sons tipo crepitação, pouco audíveis e abafados, com frequência de duas vezes por minuto; 3-sons tipo borborismo, bem audíveis, com frequência de uma vez por minuto; 4- sons tipo borborismo, bem audíveis, com frequência de duas vezes por minuto. Registrou-se o resultado de todos quadrantes em conjunto para os cálculos estatísticos.

Aferiu-se a frequência cardíaca por auscultação pelo estetoscópio e a respiratória por observação dos movimentos torácicos. Mediu-se a pressão arterial

não invasiva com transdutor Doppler na artéria coccígea e manguito na cauda, cuja extremidade caudal foi posicionada 4 cm proximal ao sensor.

4.5 Metodologia estatística

Parâmetros Farmacodinâmicos

Inicialmente a distribuição das variáveis foi analisada e estatísticas descritivas produzidas para construir curvas de variação longitudinal nas variáveis-resposta para cada tratamento. Usaram-se modelos de medidas repetidas (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) para comparar a PA (mmHg), frequência cardíaca (bpm), frequência respiratória (mov. min.), limiar nociceptivo mecânico e altura da cabeça ao chão (cms) entre os tratamentos e momentos. Um termo de interação entre tratamento e momento foi incluído em todos os modelos para testar a hipótese de que a diferença entre tratamentos foi dependente do momento analisado. Uma estrutura de covariância autorregressiva foi usada para modelar a correlação entre as medidas repetidas dentro da mesma égua. O teste de Tukey foi usado para ajustar os valores-P resultantes de comparações múltiplas. O nível de significância estatística foi definido como 0.05.

Devido à presença de graus variados de assimetria e desvios de um padrão Gaussiano de distribuição, usou-se o teste de Wilcoxon (58) para comparar os tratamentos dentro de cada momento e o método de Bonferroni (59) para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas. Realizou-se a análise estatística com o procedimento PROC NPAR1WAY (60) e definiu-se a significância estatística como $P < 0.05$.

Utilizou-se o teste de postos de sinais de Wilcoxon (Wilcoxon signed rank test) para amostras pareadas para comparar as variáveis motilidade intestinal, limiar nociceptivo elétrico e limiar nociceptivo térmico entre cada momento e o momento inicial.

Parâmetros Farmacocinéticos

Realizou-se o teste-t para comparar os parâmetros calculados na abordagem não-compartimental e estimados na abordagem compartimental, assim como para comparar os parâmetros entre grupos, como pós teste da ANOVA.

5 RESULTADOS

No início do estudo, a formulação nanoparticulada também seria injetada pela via IV, no entanto teve que ser suspensa após a injeção em quatro animais, pela ocorrência de um óbito no quarto animal durante o estudo piloto. Um equino, macho, saudável, após receber a formulação em NLS por IV apresentou decúbito, movimentos de membros e parada cardiorrespiratória. O laboratório da UFRGS confirmou o estado nanoparticulado da formulação no dia, e o laudo anatomopatológico do paciente foi de choque anafilático. Nesse mesmo dia, injetou-se a formulação em ratos e observou-se queda brusca da pressão arterial e parada cardíaca após administração IV, o que não ocorreu com a administração O. Após o lamentável episódio, decidiu-se utilizar apenas a preparação nanoparticulada por via O.

A formulação nanoparticulada apresentou uma concentração final de 3 mg/ml, o que levou a um grande volume administrado nos equinos de aproximadamente 60 ml por animal. Foram realizadas 23 tentativas para se produzir as nanopartículas com polímeros, no entanto todas as formulações precipitavam no final da fase de evaporação. Quando decidiu-se fazer a formulação lipídica, não foi possível solubilizar maior quantidade de metadona nas manteigas de cacau e cupuaçu, mesmo após tentativas com temperaturas altas e uso de ultrassom por 30 minutos. A formulação do estudo era estável somente por uma semana e antes de cada aplicação confirmou-se o estado nanoparticulado da metadona por difratometria a LASER na alíquota que o laboratório da UFRGS reservava.

A metadona livre injetável administrada por via O, também foi diluída em carboximetilcelulose 0,5%. Nos estudos pilotos, a formulação de nanopartículas não apresentava nenhum espessante, o que fazia com que parte do líquido fosse perdido da cavidade oral no momento da administração. Posteriormente testaram-se formulações espessas com carboximetilcelulose, o que diminuiu a perda. Administrou-se as formulações O e NO no espaço entre os incisivos e premolares do lado da arcada dentária direita, de forma lenta para que não houvesse perda do conteúdo pelo movimento da língua e facilitando-se que a metadona tomasse contato com o espaço sublingual.

5.1 Parâmetros farmacodinâmicos

O pH da boca apresentou valores entre 8 e 9 em todos os animais, antes de receberem metadona por via oral.

Nos animais tratados com metadona IV observou-se excitação nos primeiros 45 minutos, o que impediu a aferição de alguns parâmetros das primeiras avaliações não pudessem ser.

Dados Paramétricos

Houve diferença estatística entre grupos para os parâmetros FC, *f*, PAS e altura da cabeça, mas esta diferença dependeu do momento analisado. Parâmetro e seu valor p correspondente:

- PAS (<.0001)
- FC (<.0001)
- *f* (<.0001)
- Altura Cabeça 0,0081

Tabela 3 - Média e desvios padrão da distância entre lábio inferior e o chão em centímetros em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Altura do lábio inferior ao chão (cm)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	89	89	88	8 ^{ab}	87	89	90	88	90	90	88	88	88
DP	8	7	8	7	12	11	5	4	7	3	6	7	6
IV	87	115	110	102 ^a	102	97	98	88	93	95	91	93	90
DP	8		5	5	8	10	9	4	9	6	9	3	6
NO	80	84	84	89 ^{ab}	85	86	84	84	82	84	83	83	86
DP	5	11	10	2	8	4	11	6	3	4	7	6	6
O	88	81	83	80 ^b	84	88	83	83	83	88	91	88	90
DP	4	13	12	16	13	5	7	5	15	8	6	6	5

Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

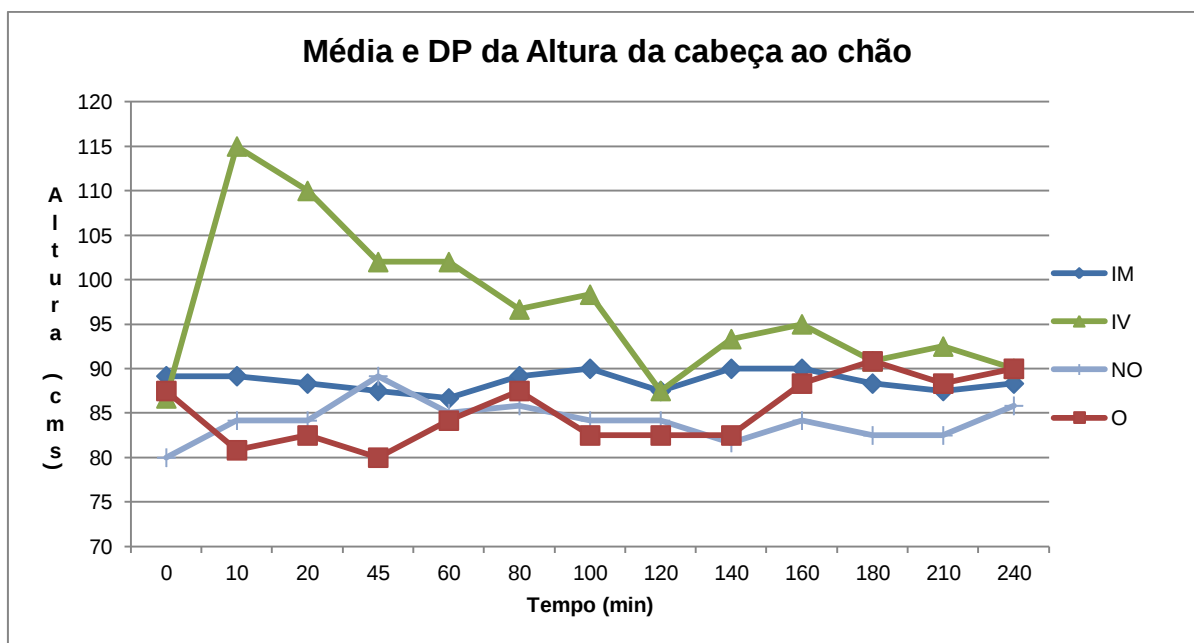


Figura 3 - Média e desvios padrão da altura do lábio inferior ao chão (cm) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O.

A distância entre lábio inferior e o chão foi registrada em apenas um animal aos 10 e três animais aos 20 minutos após metadona IV, devido à excitação e locomoção dos animais. Desta forma eliminaram-se estes momentos da análise estatística. A única diferença entre os grupos foi aos 45 minutos em que os valores do grupo IV foram superiores a O.

Pressão arterial sistólica

Tabela 4 - Média e desvios padrão da PAS não invasiva em mmHg, em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Pressão Arterial Sistólica (mmHg)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	124	142 ^b	139 ^b	140 ^b	148 ^{ab}	139	141	131	137	134	129	120	120
DP	16	15	5	11	18	14	213	13	16	15	9	8	12
IV	117	224 ^a	237* ^a	204* ^a	179* ^a	163*	149	138	132	134	120	122	118
DP	8	20	28	23	28	19	16	21	15	16	14	16	15
NO	119	129 ^b	127 ^b	119 ^b	120 ^b	125	124	118	123	120	122	116	116
DP	9	17	13	14	9	12	12	8	9	7	8	8	5
O	122	128 ^b	128 ^b	131 ^b	138 ^b	131	135	130	133	132	132	127	131
DP	15	24	18	22	28	30	22	29	29	26	29	22	20

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

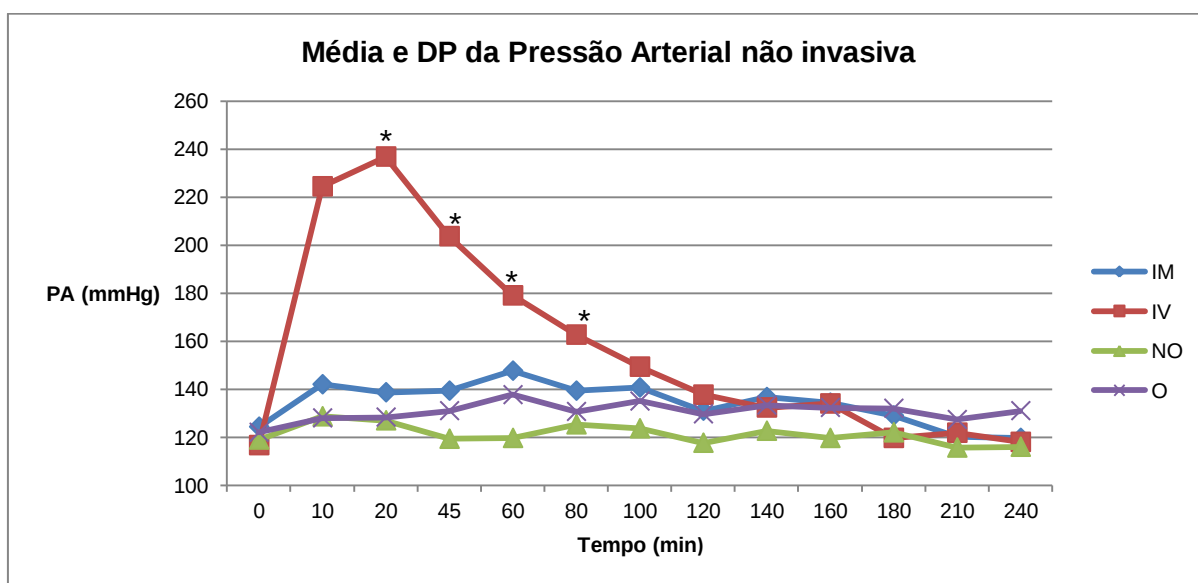


Figura 4 - Média e desvios padrão da PAS (mmHg) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

A pressão arterial sistólica aumentou significativamente por 80 minutos apenas no grupo IV. No que se refere às diferenças entre os grupos, os animais que

receberam as formulações por via oral e IM apresentaram menores valores de PA que os animais tratados via IV até 60 e 45 minutos respectivamente.

Frequência Cardíaca

Tabela 5 - Média e desvios padrão da FC em batimentos por minutos (bpm) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Frequência Cardíaca (bpm)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	42	46 ^b	45 ^{ab}	48	48	50	47	47	49	49	48	46	47
DP	4	9	8	9	11	10	11	11	14	11	11	13	12
IV	45	69* ^a	61* ^a	57*	57	54	53	50	48	49	46	47	47
DP	3	10	3	6	4	5	6	7	7	8	8	7	8
NO	49	48 ^b	47 ^{ab}	47	47	46	47	48	48	47	47	48	49
DP	8	9	10	11	11	10	9	10	10	10	11	11	12
O	43	43 ^b	41 ^b	43	43	42	44	43	41	43	44	41	43
DP	3	6	3	7	7	3	8	6	5	5	6	6	9

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

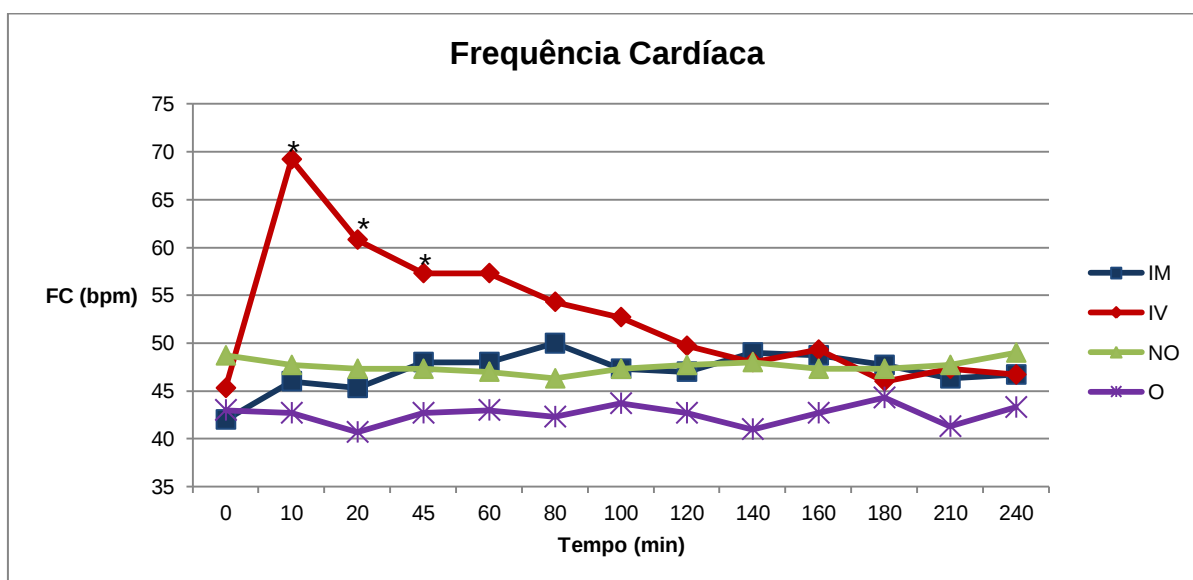


Figura 5 - Média e desvios padrão da FC (bpm) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

A frequência cardíaca foi maior quando comparado ao basal no grupo IV por 45 minutos. O resto dos grupos manteve os batimentos cardíacos sem variação com relação ao início.

Frequência Respiratória

Tabela 6 - Média e desvios padrão da f , em movimentos por minutos (mpm) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Frequência Respiratória (mpm)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	16	12	12	13	12	13 ^b	14 ^b	15	13 ^b	14	13	14	14
DP	3	1	3	3	2	3	3	3,0	2	2	3	2	3
IV	15	21	18	21	20	26* ^a	25* ^a	21	25* ^a	17	15	15	16
DP	4	8	5	9	7	6	12	6	7	2	3	3	4
NO	14	15	14	13	13	11 ^b	13 ^b	12	12 ^b	12	13	13	12
DP	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	3	2	2
O	16	15	16	14	14	14 ^b	13 ^b	13	14 ^b	15	15	14	14
DP	4	5	5	4	6	6	5	4	4	5	5	2	4

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

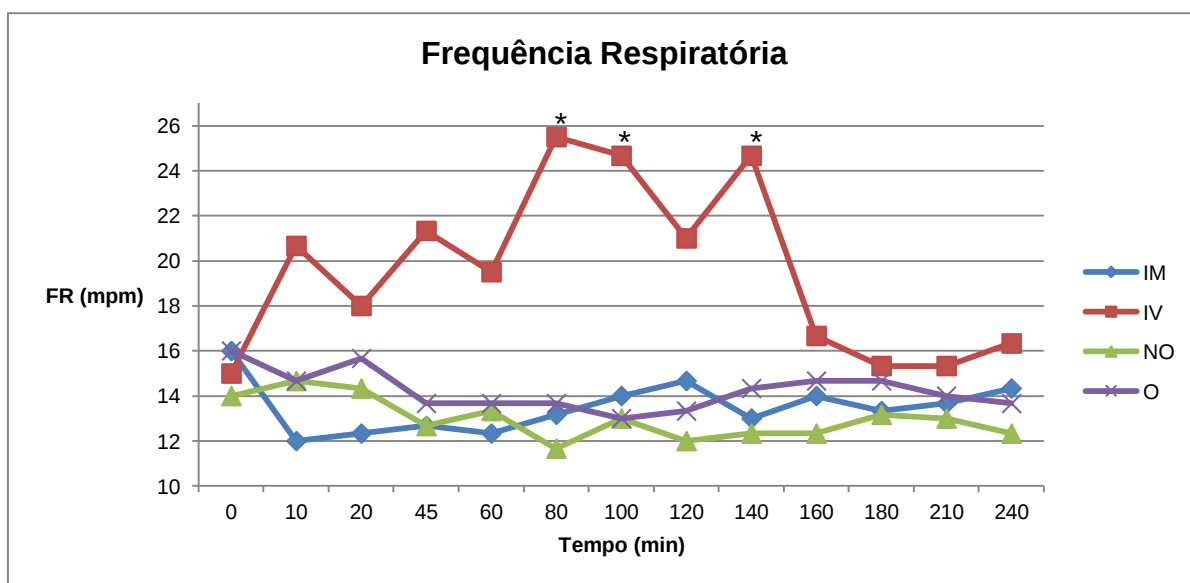


Figura 6 - Média e desvio padrão da f (mpm) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

No que se refere à frequência respiratória, encontrou-se que o grupo IV teve valores significativamente superiores ao basal e aos outros grupos nos tempo 80, 100 e 140. Deve-se ter em consideração que não foi possível aferir a frequência respiratória em todos os animais no grupo IV (tempo 10 minutos aferido em 1 animal, tempo 20 minutos aferido em 3 animais, tempo 45 e 60 minutos aferido em 5 animais), o que pode ter levado a não ter diferenças estatísticas na primeira hora do estudo.

Limiar Nociceptivo Mecânico

Tabela 7 - Média e desvios padrão do limiar nociceptivo mecânico (Joules) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Limiar Nociceptivo Mecânico (Joules)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	4,2	8,4 ^{ab}	11,1	10,4	10,0	6,6	6,2	5,0	6,4	4,1	5,3	3,0	4,6
DP	2,7	5,1	7,3	7,8	7,5	7,0	5,9	3,5	7,6	3,5	5,2	2,1	2,8
IV	4,5	17,6* ^a	17,4*	16,4*	15,2	13,3	12,1	10,8	11,5	12,7	7,8	2,6	4,0
DP	4,1	4,9	3,9	5,7	6,6	7,5	8,0	9,9	6,0	8,7	8,6	2,3	1,9
NO	3,8	3,5 ^b	6,4	7,2	8,1	6,8	5,7	5,4	7,8	6,6	5,2	5,4	2,8
DP	2,1	2,1	5,0	2,4	2,7	7,8	6,0	7,4	6,3	6,0	5,1	3,8	2,3
O	6,2	5,4 ^{ab}	8,9	9,6	7,0	7,4	6,0	6,4	5,8	5,9	3,8	3,3	4,4
DP	1,0	2,7	6,4	6,6	7,0	4,7	5,0	4,6	3,3	3,8	1,9	1,5	2,5

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

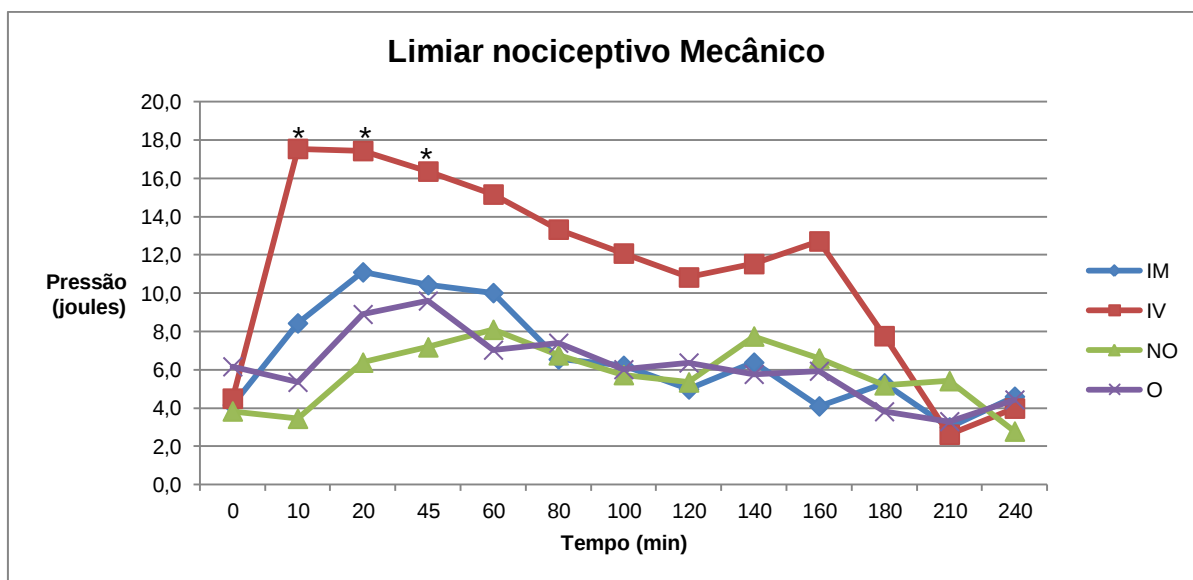


Figura 7 - Média e desvios padrão do limiar nociceptivo mecânico (Joules) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

O limiar nociceptivo mecânico teve aumento com relação ao basal no grupo IV até os 45 minutos, mostrando-se diferente do grupo NO aos 10 minutos.

Motilidade Intestinal (escala 0 a 16)

Tabela 8 - Média e desvios padrão referentes aos movimentos intestinais (escala 0-16) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Motilidade Intestinal (escala 0-16)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	15	13 ^a	12 ^a	11 ^{ab}	12 ^b	13	13	14	14	14	14 ^{ab}	15	14
DP	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1
IV	14	0 ^b	0,3 ^b	8* ^b	10* ^b	12*	13	13	14	14	15 ^{ab}	15	15
DP	1	0	9	4	2	2	2	2	2	1	1	2	1
NO	14	13 ^a	14 ^a	13 ^a	14 ^a	14	14	13	13	14	13 ^a	14	14
DP	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1
O	14	14 ^a	15 ^a	14 ^a	15 ^a	14	14	14	15	14	15 ^b	15	15
DP	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

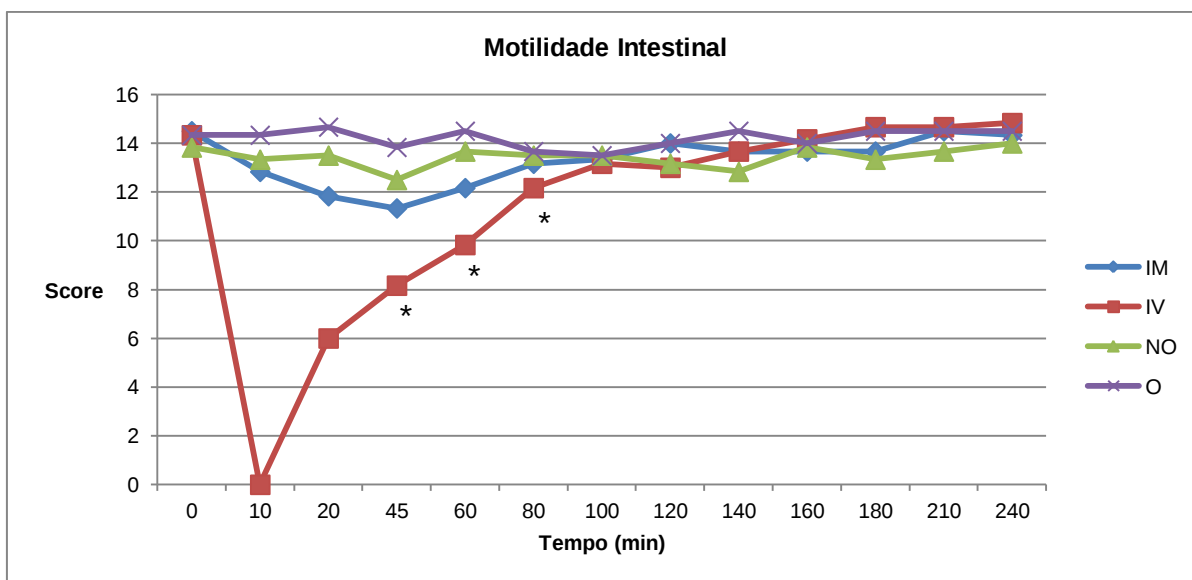


Figura 8 - Média e desvios padrão da motilidade intestinal em escala de 0 a 16 ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

Os escores de auscultação intestinal diminuíram no grupo IV entre os momentos 45 e 80 minutos com relação ao basal. Nos primeiros dois tempos de avaliação não foi possível avaliar 3 animais aos 10 minutos e 4 animais aos 20 minutos. A partir dos 45 minutos todos os animais puderam ser avaliados em todos os grupos. Os grupos que receberam a metadona por via extravascular não tiveram hipomotilidade intestinal com relação ao basal.

Limiar Nocicepivo Térmico

Tabela 9 - Média e desvios padrão do limiar nocicepivo térmico aferido na região metacarpiana, registrando-se a diferença entre a temperatura da pele e a reação aversiva ao estímulo (°C) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Limiar Nocicepivo Térmico (°C)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	16	16 ^b	19 ^b	19 ^{ab}	22* ^b	21* ^{ab}	20 ^{ab}	18	18 ^{ab}	16	16	18	17
DP	3	5	4	5	4	4	5	5	5	6	7	7	8
IV	18	28 ^a	29 ^a	26 ^a	26* ^a	24* ^a	22 ^a	22	23 ^a	15	17	14	15
DP	4	1	3	5	1	5	5	3	5	10	10	9	9
NO	14	13 ^b	16 ^b	15 ^b	15 ^b	14 ^c	15 ^b	16	16 ^b	14	14	14	14
DP	2	4	4	4	2	2	4	4	4	6	3	2	3
O	22	21 ^{ab}	22 ^{ab}	20 ^{ab}	19 ^b	17 ^{bc}	18 ^{ab}	20	21 ^{ab}	19	19	16	13
DP	10,1	7,9	9,6	7,5	6,7	6,6	7,8	8,4	7,2	7,7	6,8	5,6	6,2

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

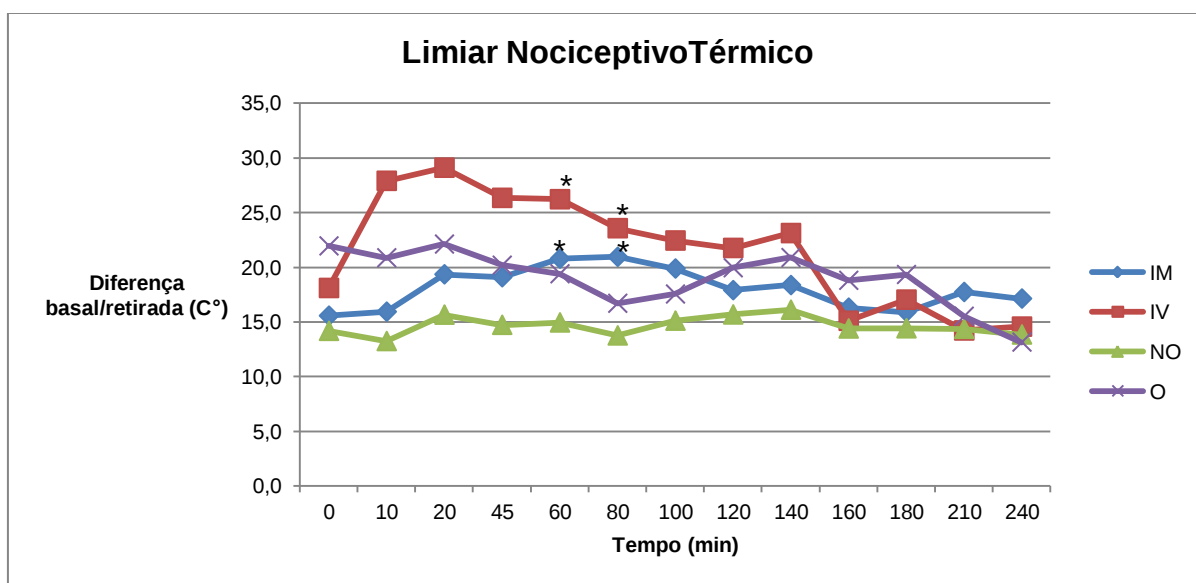


Figura 9 - Média e desvio padrão do limiar nocicepivo térmico, registro da diferença entre a temperatura da pele e da retirada do membro (°C) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

No que se refere ao estímulo nociceptivo térmico foram registrados aumentos significativos nos limiares aos 60 e 80 minutos nos grupos IM e IV. Já os grupos que receberam o fármaco por via oral não tiveram diferenças com relação ao basal.

Limiar nociceptivo elétrico

Tabela 10 - Média e desvios padrão referentes ao limiar nociceptivo elétrico (Volts) em seis equinos tratados com metadona IM, IV, NO e O.

Limiar Nociceptivo Elétrico (V)													
	0	10	20	45	60	80	100	120	140	160	180	210	240
IM	3	6 ^{ab}	7* ^{ab}	7* ^{ab}	7* ^{ab}	7	7*	6	6*	5	5	5	5
DP	2	4	4	4	3	4	4	3	4	3	3	3	3
IV	4	11 ^a	12 ^a	14* ^a	9* ^a	10*	9*	7*	7*	7*	8*	5	5*
DP	2	7	8	10	6	7	5	4	5	4	4	2	2
NO	3	3 ^b	3 ^c	4 ^b	3 ^b	4	5	4	5	5	5	5	5
DP	2	2	1	2	1	3	4	3	4	4	3	3	4
O	3	4 ^b	4 ^{bc}	4 ^b	4 ^{ab}	5	4	4	5	5	4	4	4
DP	1	3	3	2	2	3	2	3	2	4	2	2	1

Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento tempo basal. Letras comparam médias entre grupos ($p < 0,05$).

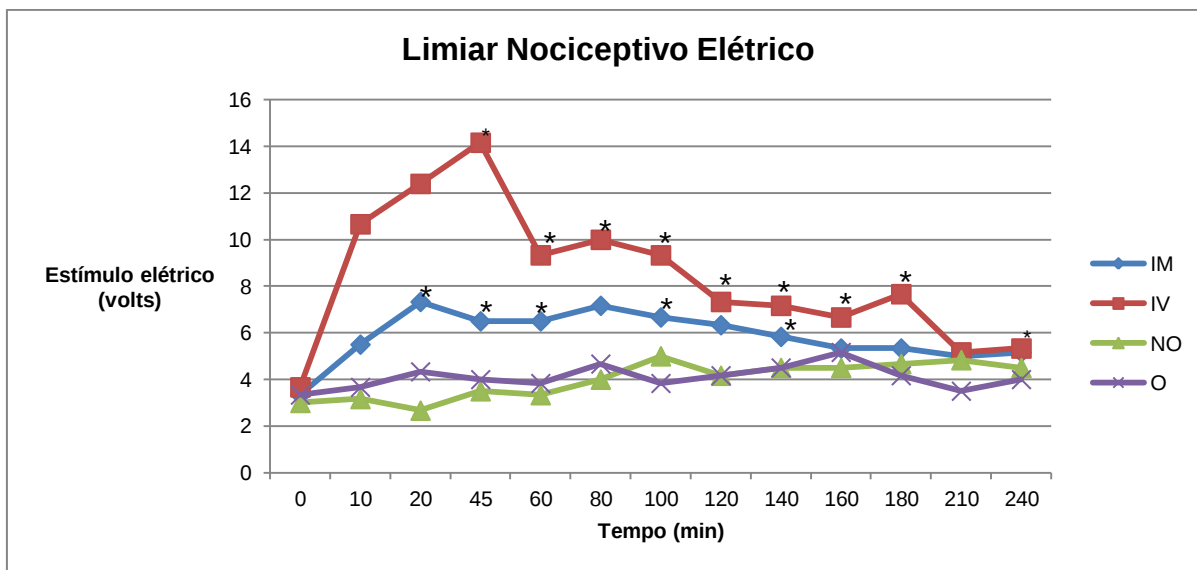


Figura 10 - Média e desvio padrão do limiar nociceptivo elétrico (volts) ao longo do tempo para os grupos IM, IV, NO e O. Asterisco expressa diferenças ao longo do tempo em cada grupo em relação ao momento basal ($p < 0,05$).

O grupo IM teve valores significativamente maiores no limiar nociceptivo elétrico quando comparado ao valor basal até 140 minutos, excluindo os tempos 10, 80 e 120. Aos 10 minutos no grupo IV somente foi possível avaliar o limiar elétrico em 3 animais, o que levou a não ter diferença significativa com o basal. O grupo IV foi o que teve mais tempo de aumento de limiar nociceptivo elétrico já que foi maior ao basal desde o tempo 45 até a última avaliação (240 minutos), excluindo o tempo 210 minutos.

5.2 Parâmetros farmacocinéticos

Reduziram-se os números de pontos para os cálculos farmacocinéticos não compartimentais e compartimentais, pois havia pontos muito próximos desnecessários para caracterizar o perfil. As concentrações plasmáticas individuais para todos os tempos se apresenta nos Apêndices V a VIII.

Apesar do modelo de um compartimento com peso dois descrever adequadamente os dados plasmáticos, ao se observar o perfil percebe-se que há uma saturação. Como a biodisponibilidade (F) foi maior que um, os parâmetros

depuração (Cl) e volume de distribuição (Vd) das vias extravasculares foram calculados sem utilizar o valor de F para não gerar valores incorretos.

O modelo de um compartimento aberto com eliminação de primeira ordem descreveu adequadamente os dados plasmáticos após administração IV, IM, O e NO. Para todas as vias escolheu-se o modelo com esquema de peso dois, por apresentar o melhor ajuste dos pontos, de acordo com os perfis individuais e o critério de seleção de modelo do programa.

Cloridrato de Metadona: Intravenoso

Abordagem Não-Compartimental

Tabela 11 - Concentrações plasmáticas individuais, média e DP (ng/mL) de cloridrato de metadona em equinos tratados por via IV (0,5 mg/kg) ao longo do tempo (n=6).

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	Media	DP
C₀	404,0	445,7	468,8	487,9	706,7	442,8	492,8	108,4
3	387,7	400,2	457,8	463,5	661,9	425,8	466,1	100,5
10	350,3	311,1	433,0	411,3	568,0	388,5	410,4	88,7
15	309,7	250,7	418,9	380,5	523,9	367,9	375,3	93,7
20	274,6	302,5	395,9	423,8	494,9	287,2	363,2	88,8
30	276,2	305,9	381,6	405,3	470,9	293,6	355,6	76,2
45	201,4	182,1	314,1	399,4	433,4	316,8	307,9	101,4
60	169,6	109,4	278,6	266,6	359,9	267,3	241,9	88,7
120	55,8	26,6	77,1	107,1	107,0	111,6	80,9	34,4
180	16,5	ILQ	31,1	50,3	36,0	32,1	33,2	12,1

ILQ: Inferior ao limite de quantificação

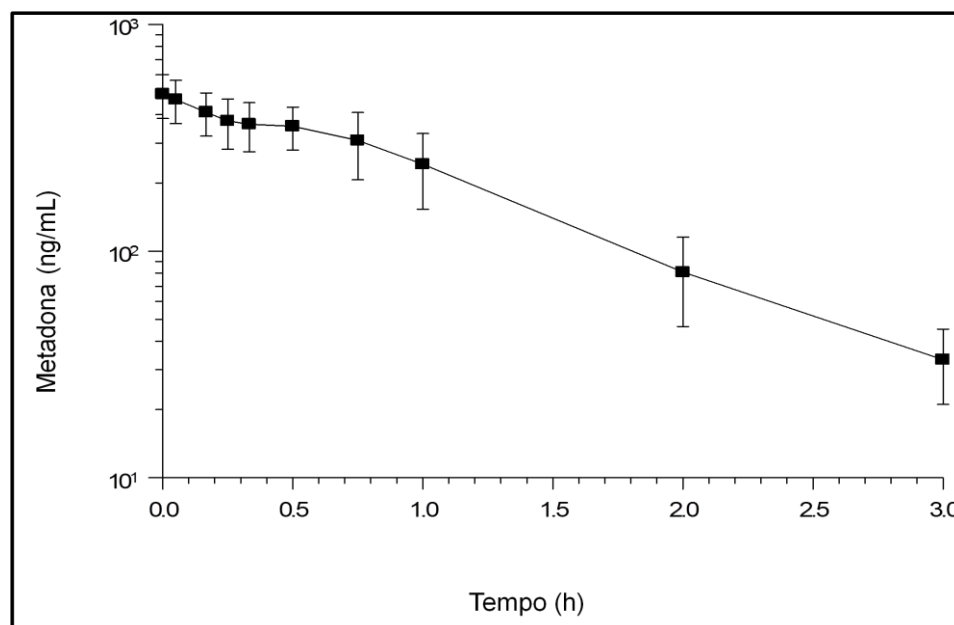


Figura 11 – Concentração plasmática do cloridrato de metadona (ng/mL) após administração de 0,5 mg/kg IV (n=6) ao longo do tempo (média ± DP).

Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via IV (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
λ (h ⁻¹)	1,2	1,4	1,1	0,8	1,2	1,1	1,1	0,2
$t_{1/2}$ (h)	0,6	0,5	0,6	0,8	0,6	0,7	0,6	0,1
ASC 0-t (ng*h/mL)	415,5	325,3	602,3	659,7	791,6	587	563,6	168,5
ASC extr (ng*h/mL)	14,1	18,8	28,4	60,4	31,3	30,4	30,5	16,1
ASC 0- ∞ (ng*h/mL)	429,7	344,1	630,7	720,1	822,9	617,4	594,1	178,7
% EXTRAPOL	3,3	5,5	4,5	8,4	3,8	4,9	5,1	1,8
CI (L/h/kg)	1,7	1,5	0,8	0,7	0,6	0,8	0,9	0,3
ASMC 0-t	334,2	185,7	507,9	607,7	667	556,3	476,5	182
ASMC extr	54,4	50,9	111,0	253,4	121,1	119,7	118,4	73,4
ASMC 0- ∞	388,7	236,5	618,9	861,1	788,1	676	594,9	239,3
TRM (h)	0,9	0,7	1,0	1,2	1,0	1,1	1,0	0,2
Vd (L/kg)	1,1	1,0	0,8	0,8	0,6	0,9	0,9	0,2

Os tempos de colheita foram acima do necessário, daí a eliminação de alguns momentos para melhor caracterização do perfil plasmático.

A $t_{1/2}$ foi curta dada à inclinação pronunciada da curva. A CI apresentou um valor alto, o que produz um TRM curto, neste caso uma hora. Considera-se que no TRM quando 63% do fármaco é eliminado do organismo.

Para saber se a depuração é alta ou não, deve-se calcular a taxa máxima de depuração para nosso modelo, avaliando-se primeiramente o débito cardíaco pela fórmula:

$$\text{Débito cardíaco} = 180 \times \text{Peso Corporal}^{-0,19}$$

Ao se calcular o débito cardíaco para as éguas de peso médio de 354 kg desse estudo, chega-se a um valor de 59 mL/kg/min. A metade do débito cardíaco dirige-se aos dois principais órgãos de eliminação de fármacos do sistema: fígado e rim e, portanto, esta é a cifra que corresponde à maior taxa de depuração possível, ou seja, para o presente estudo, o valor de 29,5 mL/kg/min ou 1.77 L/h/kg.

Abordagem compartimental

O modelo se baseou na seguinte equação: $C = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t}$

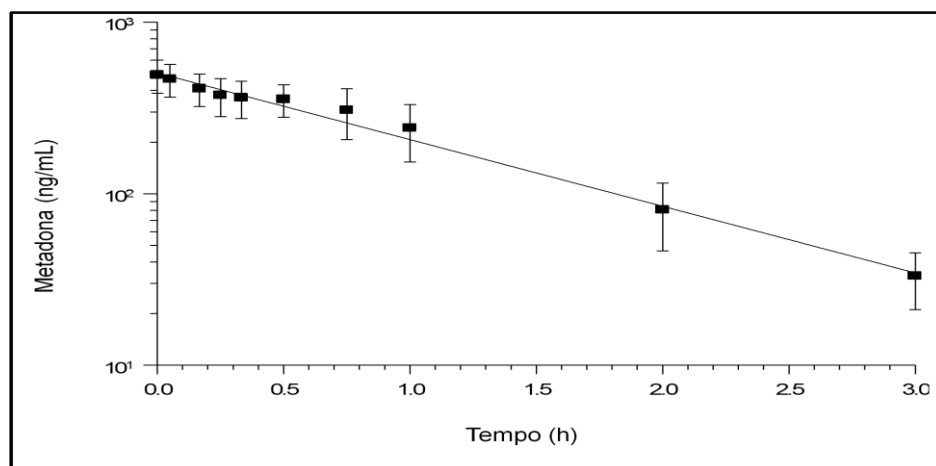


Figura 12 - Perfil plasmático do cloridrato de metadona após administração de 0,5 mg/kg IV em equinos, baseado em modelo de um compartimento (n=6) (media $\pm$ DP) ao longo do tempo.

Tabela 13 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) em modelo de um compartimento do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via IV (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
Vd (L/kg)	1,2	1,2	0,9	1,0	0,7	1,1	1,0	0,2
ke (h ⁻¹)	1,1	1,4	0,9	0,8	0,97	0,8	1,0	0,2
t _{1/2} (h)	0,7	0,5	0,7	0,9	0,71	0,8	0,7	0,1
Cl (L/h/kg)	1,2	1,6	0,9	0,7	0,67	0,9	1,0	0,3
TRM (h)	1,0	0,7	1,1	1,3	1,03	1,2	1,1	0,2
ASC 0-inf (ng*h/mL)	407	316,6	580,1	677,4	749,54	549,4	546,7	162,4

Cloridrato de Metadona: IM

Abordagem Não compartimental

Tabela 14 - Concentrações plasmáticas individuais, média e DP (ng/mL) de cloridrato de metadona em equinos tratados por via IM (0,5 mg/kg) ao longo do tempo (n=6).

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	Media	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	208,5	226,1	215,4	421,8	326,7	286,8	280,8	83,1
5	235,1	260,9	228,1	377,6	336,3	288,4	287,7	59,1
10	234,9	262,2	250,4	418	374,6	317,3	309,6	73,9
15	225,8	246,8	282,6	476,5	407,2	280,9	319	99,3
20	230,6	207,2	233	361,7	439,6	306,9	296,5	90,8
30	191,3	211,4	223,6	368,4	353,5	261,9	268,4	75,5
45	194,6	202,7	139	275,2	311,9	244,7	228,0	62
60	213,9	191,8	161,4	202,1	264,7	253,6	214,6	38,8
120	156,9	109,8	134,8	107,8	143,8	152,0	134,2	21,1
240	48,7	40,3	45,6	7,6	4,8	41,1	47,1	19,7
360	12,8	ILQ	14,7	ILQ	ILQ	7,3	11,7	3,6

ILQ: Inferior ao limite de quantificação

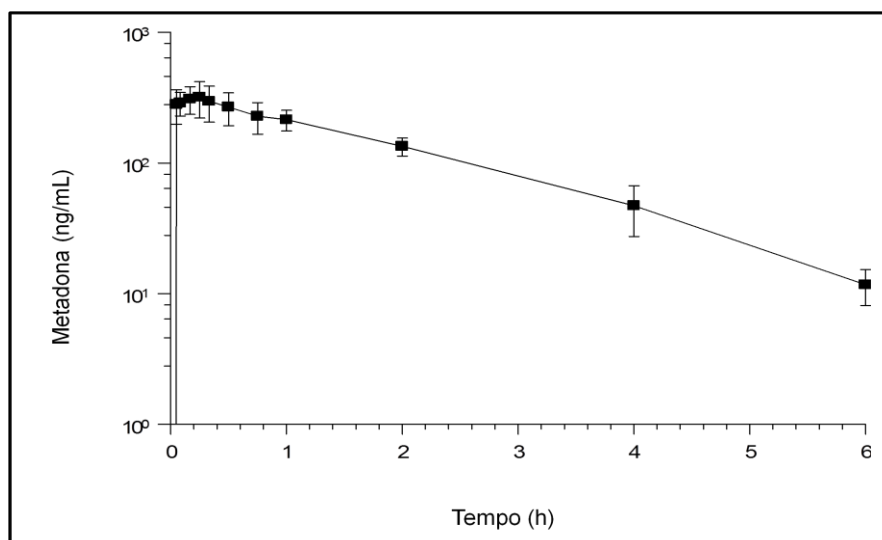


Figura 13 - Concentração plasmática do cloridrato de metadona (ng/mL) após administração de 0,5 mg/kg IM (n=6) ao longo do tempo (média $\pm$ DP).

Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via IM (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
λ (h ⁻¹)	0,6	0,5	0,6	1,3	1,7	0,7	0,9	0,5
$t_{1/2}$ (h)	1,1	1,4	1,3	0,5	0,4	0,9	0,9	0,4
ASC 0-t (ng*h/mL)	657,3	512,5	586,1	600,5	690,8	709,1	626,1	73,8
ASC extr (ng*h/mL)	20,3	80,3	26,5	5,8	2,8	10,4	24,4	28,8
ASC 0- ∞ (ng*h/mL)	677,7	592,8	612,6	606,3	693,6	719,5	650,4	53,1
% EXTRAPOL	3,0	13,6	4,3	1,0	0,4	1,4	4,0	4,9
Cl/F (L/h/kg)	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,1
ASMC 0-t	1145,9	689,5	1028,3	603,6	745,5	1087,7	883,4	230,9
ASMC extr	154,4	481,6	206,7	27,5	12,9	76,2	159,9	174,3
ASMC 0- ∞	1300,4	1171,1	1234,9	631,1	758,4	1164,0	1043,3	277,4
TRM (h)	1,9	2,0	2,0	1,0	1,1	1,6	1,6	0,4
Vd/F (L/kg)	0,7	0,6	0,8	1,0	0,7	0,8	0,7	0,1
F	1,6	1,7	1,0	0,8	0,8	1,2	1,2	0,4

Da mesma forma que no grupo IV, a λ foi acentuada para a via IM, o que caracteriza um rápido desaparecimento do fármaco do primeiro compartimento. A λ

também caracteriza a rápida $t_{1/2}$. A porcentagem de extrapolação foi inferior a 20% em todos os animais, o que demonstra que os tempos de colheita foram suficientes para caracterizar a farmacocinética do fármaco.

Abordagem compartimental

Tal abordagem se baseou na seguinte equação: $C = \frac{D \cdot F \cdot ka}{Vd \cdot (ka - ke)} \cdot (e^{-ke \cdot t} - e^{-ka \cdot t})$

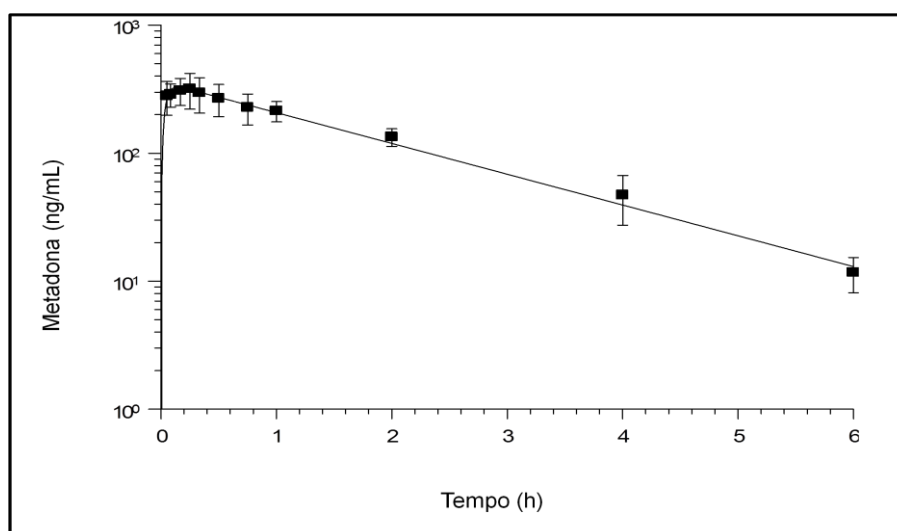


Figura 14 - Perfil plasmático do cloridrato de metadona após administração de 0,5 mg/kg IM em equinos, baseado em modelo de um compartimento (n=6) (média $\pm$ DP) ao longo do tempo.

Tabela 16 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) em modelo de um compartimento do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via IM (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
Vd (L/kg)	1,8	0,6	1,9	0,5	0,8	1,1	1,1	0,6
Ke (h-1)	0,5	1,8	0,5	0,9	1,2	1,3	1,0	0,5
ka (h-1)	28,3	38,4	35,3	21,8	9,9	25,5	26,5	10,2
$t_{1/2}$ (h)	1,4	0,4	1,5	0,8	0,6	0,5	0,9	0,5
Cl (L/h/kg)	0,9	1,1	0,9	0,4	1,0	1,4	1,0	0,3
ASC 0- ∞ (ng*h/mL)	559,9	439,3	554,8	1176,56	518,8	355,4	600,8	292,7

Neste caso, além dos parâmetros calculados para a via IV, há também o valor de k_a , o qual se refere à absorção do fármaco proveniente da via extravascular. Da mesma forma que para IV, o V_d foi próximo de um, e dada à rápida depuração, o $t_{1/2}$ foi somente de 0,86 horas.

Cloridrato de Metadona: Oral

Abordagem Não compartimental

Tabela 17 - Concentrações plasmáticas individuais, média e DP (ng/mL) de cloridrato de metadona em equinos tratados por via O (0,5 mg/kg) ao longo do tempo (n=6).

Tempo	Esquecida	Marjori	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MEDIA	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	268,1	49,9	56,3	63,3	38,4	114,7	98,5	87,2
5	346,6	133,7	91,5	118,8	41,6	159,9	148,7	105
10	390,3	185,3	96,1	115,2	122,3	176,3	180,9	108,5
15	372,3	196,2	117,3	102,4	139,5	221,1	191,5	99,7
20	499,2	155,3	194	264,5	160,6	238,9	252,1	128,4
30	387	128,8	155,9	390,6	309,2	354,1	287,6	116,6
45	370,3	113,4	258,2	156,5	202,9	333,6	239,2	100,4
60	322,7	129	211,9	155,1	103	209,3	188,5	78,7
120	198,1	134	123,9	79,8	110,5	170,5	136,1	42,4
240	73,9	61,2	54,1	32,2	29,1	73,5	51,3	19,6
360	14,7	ILQ	10,8	ILQ	10,7	17,3	13,4	3,3

ILQ: Inferior ao limite de quantificação

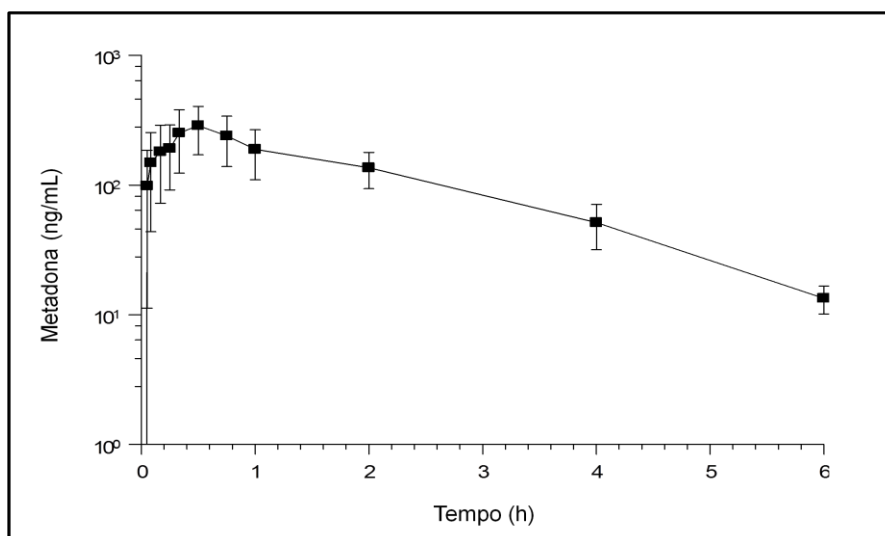


Figura 15 - Concentração plasmática do cloridrato de metadona (ng/mL) após administração de 0,5 mg/kg O (n=6) ao longo do tempo (media $\pm$ DP).

Tabela 18 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via O (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK oral	Esquecida	Marjori	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
λ (h ⁻¹)	0,7	0,4	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,1
$t_{1/2}$ (h)	1,1	1,8	1,1	1,5	1,2	1,2	1,3	0,3
ASC 0-t (ng*h/mL)	991,9	459,0	583,9	430,0	460,2	785,1	618,4	225,6
ASC extr (ng*h/mL)	22,6	156,2	17,7	70,9	18,3	30,4	52,7	54,5
ASC 0- ∞ (ng*h/mL)	1014,5	615,2	601,5	501,0	478,5	815,5	671,0	206,3
% EXTRAPOL	2,2	25,4	2,9	14,2	3,8	3,7	8,7	9,3
Cl/F (L/h/kg)	0,5	0,8	0,8	1,0	1,0	0,6	0,8	0,2
ASMC 0-t	775,0	1451,9	679,3	1078,3	1020,6	1621,6	1104,4	370,2
ASMC extr	140,8	235,2	156,3	134,9	398,7	170,6	206,1	101,0
ASMC 0- ∞	915,6	1687,1	835,6	1213,2	1419,2	1792,2	1310,0	394,1
TRM (h)	1,9	2,1	1,7	2,0	2,3	1,8	2,0	0,2
Vd/F(L/kg)	0,5	0,6	0,8	1,2	1,0	0,7	0,8	0,3
F	2,4	1,9	1,0	0,8	0,6	1,4	1,4	0,7

Abordagem Compartmental

Baseou-se na seguinte equação: $C = \frac{D \cdot F \cdot ka}{Vd \cdot (ka - ke)} \cdot (e^{-ke \cdot t} - e^{-ka \cdot t})$

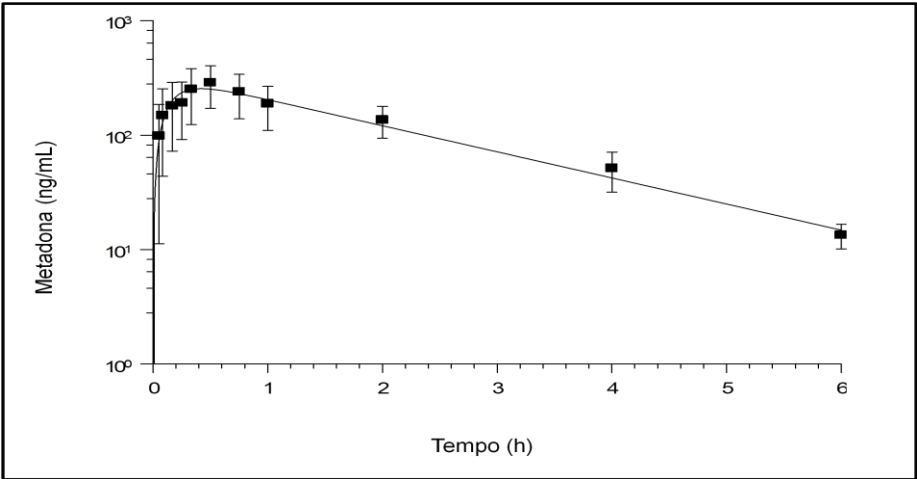


Figura 16 - Perfil plasmático do cloridrato de metadona após administração de 0,5 mg/kg O em equinos, baseado em modelo de um compartimento (n=6) (media ± DP) ao longo do tempo.

Tabela 19 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) em modelo de um compartimento do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via O (0,5 mg/kg).

Parametros PK	Esquecida	Marjori	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
Vd (L/kg)	1,0	3,1	1,3	2,4	2,3	1,4	1,9	0,8
Ke (h-1)	0,6	0,2	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1
ka (h-1)	13,2	10,0	2,6	6,0	3,6	5,5	6,8	4,0
t _{1/2} (h)	1,2	2,9	1,2	1,4	1,3	1,4	1,6	0,7
Cl (L/h/kg)	0,6	0,7	0,9	1,2	1,2	0,7	0,9	0,3
ASC 0-∞ (ng*h/mL)	902,0	680,8	549,2	432,4	413,5	729,5	617,9	188,7

Metadona NO

Abordagem Não compartimental

Tabela 20 - Concentrações plasmáticas individuais, média e DP (ng/mL) de cloridrato de metadona em equinos tratados por via NO (0,5 mg/kg) ao longo do tempo (n=6).

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MEDIA	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	123,5	102,4	49,6	151,6	29,4	85,6	90,3	45,6
5	138,7	152,7	49,6	152,8	46,6	120,6	110,2	49,5
10	146,5	168,7	83,8	182,6	50,7	152,0	130,7	51,9
15	205,8	170,3	118,3	189,3	88,2	197,2	161,5	47,6
20	187,0	142,9	112,3	207,2	124,9	232,1	167,7	48,2
30	185,5	180,0	99,1	184,4	103,6	212,2	160,8	47,4
45	182,2	160,7	210,7	169,2	95,6	262,1	180,1	55,3
60	269,0	86,8	188,7	153,6	98,5	280,5	179,5	82,6
120	110,3	41,8	104,3	97,2	114,1	176,7	107,4	43,1
240	59,9	23,5	32,9	49,2	35,2	75,3	54,6	19,3
360	25,5	ILQ	13,6	21,5	ILQ	15,19	19	5,5

ILQ: Inferior ao limite de quantificação

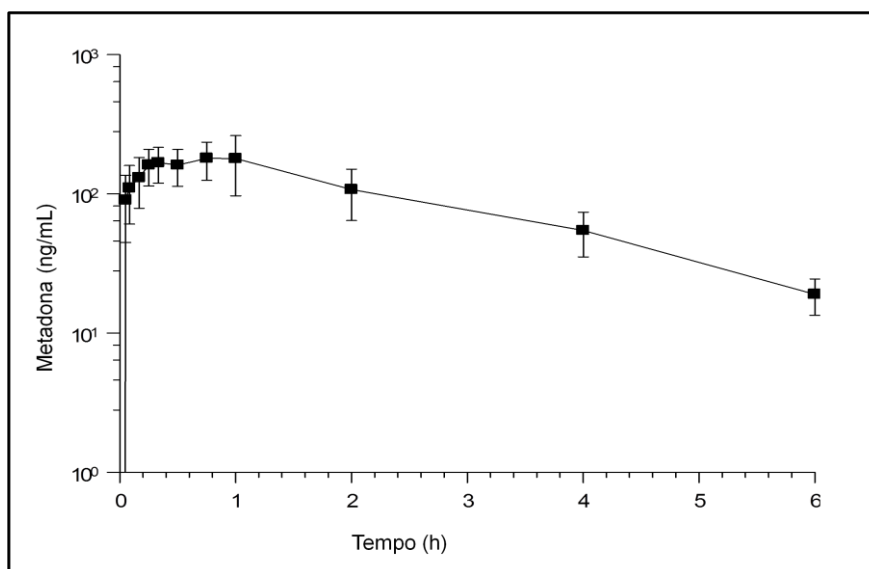


Figura 17 - Concentração plasmática do cloridrato de metadona (ng/mL) após administração de 0,5 mg/kg NO (n=6) ao longo do tempo (media $\pm$ DP).

Tabela 21 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) obtidos por análise não compartimental do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via NO (0,5 mg/kg).

Parâmetros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MÉDIA	DP
λ (h ⁻¹)	0,4	0,3	0,5	0,4	0,6	0,6	0,5	0,1
$t_{1/2}$ (h)	1,9	2,4	1,4	1,8	1,2	1,1	1,6	0,5
ASC 0-t (ng*h/mL)	629,1	277,4	462,9	514,7	344,5	784,7	502,2	186,0
ASC extr (ng*h/mL)	69,6	81,2	26,8	57,8	60,0	24,8	53,3	22,9
ASC 0- ∞ (ng*h/mL)	698,7	358,6	489,7	571,8	404,5	809,4	555,5	173,9
% EXTRAPOL	10,0	22,6	5,5	10,0	14,8	3,1	11,0	7,0
Cl (L/h/kg)	0,7	1,39	1,0	0,9	1,2	0,6	1,0	0,3
ASMC 0-t	1199,6	335,3	834,1	977,8	581,4	1487,1	902,6	416,0
ASMC extr	607,9	605,7	213,4	494,8	342,0	188,9	408,8	188,0
ASMC 0- ∞	1807,6	941,0	1047,6	1472,6	923,4	1676,0	1311,4	390,5
TRM (h)	2,6	2,6	2,1	2,6	2,3	2,1	2,4	0,3
Vd (L/kg)	0,7	1,0	1,0	1,0	1,2	0,7	0,9	0,2
F	1,7	1,1	0,8	0,9	0,5	1,4	1,1	0,4

Abordagem Compartmental

Utilizou-se a seguinte equação: $C = \frac{D \cdot F \cdot ka}{Vd \cdot (ka - ke)} \cdot (e^{-ke \cdot t} - e^{-ka \cdot t})$

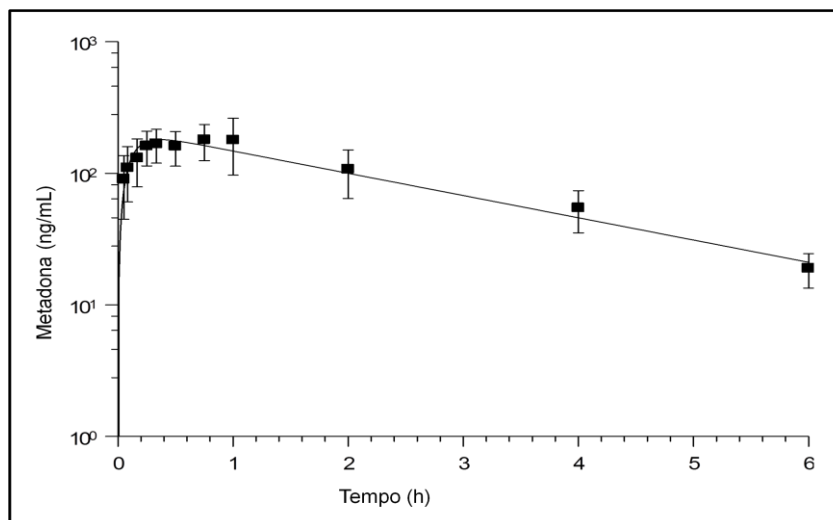


Figura 18 - Perfil plasmático do cloridrato de metadona após administração de 0,5 mg/kg NO em equinos, baseado em modelo de um compartimento (n=6) (média $\pm$ DP) ao longo do tempo.

Tabela 22 - Parâmetros farmacocinéticos (individuais e média) em modelo de um compartimento do cloridrato de metadona em seis equinos tratados por via NO (0,5 mg/kg).

Parametros PK	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	MEDIA	DP
Vd (L/kg)	2,3	2,8	2,5	2,4	3,8	1,3	2,5	0,8
Ke (h⁻¹)	0,4	0,6	0,5	0,4	0,3	0,5	0,5	0,1
ka (h⁻¹)	12,3	19,2	3,5	20,3	4,3	3,8	10,5	7,8
t_{1/2} (h)	2,0	1,2	1,5	1,8	2,1	1,3	1,6	0,4
Cl (L/h/kg)	0,8	1,7	1,2	0,9	1,3	0,7	1,1	0,4
ASC 0-∞ (ng*h/mL)	634,9	300,8	425,9	560,6	389,4	701,1	502,1	154,7

O grupo NO foi o que teve menor ASC 0- ∞ , o que caracteriza uma depuração mais rápida. Comparado aos outros grupos, as nanopartículas apresentaram maior ka e Vd. A t_{1/2} foi mais longa neste caso, pois a inclinação da curva foi menor. Não houveram diferenças, no entanto, entre as ASC 0- ∞ dos grupos O e NO.

6. DISCUSSÃO

Contrariamente à hipótese 1 alvo do estudo, a metadona NO apresentou o mesmo perfil farmacocinético e farmacodinâmico que a metadona O e, portanto, a hipótese foi negada pelo fato da via NO não incrementar a antinocicepção, nem a biodisponibilidade.

A hipótese 2 foi parcialmente confirmada, já que apesar da metadona IM apresentar efeito antinociceptivo inferior à IV, não ocorreram os efeitos adversos presentes nos animais tratados com metadona IV.

Baseado na relação custo-benefício do uso de opioides em equinos, em que considera-se como custo os efeitos indesejáveis e o benefício a analgesia, pode-se dizer que a via IM apresentou resultados promissores, contrariamente à IV.

Farmacodinâmica

Provavelmente não se observaram diferenças mais marcantes entre os grupos nos dados farmacodinâmicos pela variabilidade dos dados e pequeno número de animais utilizados, já que o cálculo do número de animais para um poder do teste em 80% foi baseado na farmacocinética e não na farmacodinâmica.

A excitação, com consequente aumento na atividade locomotora, já foi amplamente relatada em equinos que recebem opioides em pesquisa experimental. Tal fenômeno interfere sobejamente na avaliação dos estímulos nociceptivos aplicados nos membros (2, 4, 12). Atribuem-se tais mudanças comportamentais à liberação de catecolaminas endógenas, ativação de receptores dopaminérgicos e distribuições diferentes dos receptores opioides entre as espécies (3, 54). Por outro lado optou-se em utilizar a dose de 0,5 mg/kg de metadona neste estudo, por ser a mínima que desencadeia antinocicepção no cavalo (12).

A excitação e aumento da atividade locomotora pode explicar pelo menos parcialmente a ativação do sistema nervoso simpático, assinalada por aumento da PAS, FC e *f*, nos animais do grupo IV (4, 12) no entanto a PAS supera os valores observados em equinos após exercício, já que Giudice *et al.* (55) registraram médias para PAS após 60 minutos de galope e trote de 41.52 ± 11.32 mmHg. Neste estudo os valores médios de PAS chegaram a 236 mmHg, o que se deveria a algum outro

fator além da excitação, explicação está além do escopo deste estudo. Bovinos tratados com 0,6 mg/kg de metadona subcutânea, exibiram aumento da PAS por 130 minutos sem variações na FC e no que se refere ao comportamento, a atividade locomotora não aumentou, apesar do aumento de movimentos de cauda (56).

A mensuração da distância do lábio inferior ao solo foi prejudicado no grupo IV, dada à excitação e locomoção dos animais e, portanto não tem significado para este grupo. No que concerne aos outros grupos observa-se que aparentemente a metadona não apresenta efeito sedativo independente da via administrada (12).

A hipomotilidade intestinal é um sinal clássico em equinos que recebem opioides e apresenta duração de duas horas após administração de morfina IM e IV (3) e metadona IV (12) e quatro horas após buprenorfina IV (57). No homem a metadona apresenta menor impacto na motilidade intestinal, o que está de acordo com o presente trabalho, em que somente a via IV apresentou hipomotilidade por um período de 100 minutos, sem nenhuma demonstração de sinais de desconforto abdominal (9).

No que concerne à antinocicepção, a metadona aumentou o limiar para estímulo mecânico apenas quando administrada por via IV. Os limiares médios máximos foram de 17,6 e 11,1 após a administração de metadona IV e IM, aos 10 e 20 minutos respectivamente, valores estes acima do reportado por (58) com o uso IV de butorfanol e buprenorfina.

Para o estímulo térmico o aumento do limiar foi mais pronunciado que para o mecânico, entretanto mais curto, que o observado com o uso da associação de acepromazina com butorfanol ou buprenorfina em equinos, que aumentaram o limiar nociceptivo térmico por 2,9 e 9,4 horas respectivamente (58). A duração da antinocicepção para o estímulo térmico foi mais prolongada que o reportado com o uso da lâmpada de calor (12). Tal achado pode ser justificado pelo fato que a lâmpada mantém uma alta temperatura constante até o reflexo de retirada do membro, diferentemente deste estudo, onde a temperatura é aumentada progressivamente. Para estimular as fibras C deve-se aumentar lentamente a temperatura, o que vem de encontro as características farmacológicas da metadona, que como opioide em altas doses atua predominantemente em fibras C.

Alterações da temperatura cutânea basal interferem nas mensurações de limiar térmico. Neste estudo não ocorreu alteração da temperatura cutânea basal ao longo do tempo.

Quanto ao estímulo elétrico o aumento do limiar se prolongou por 140 e 240 minutos após o uso de metadona IM e IV respectivamente, contrariamente ao que se observou com dose de 0,2 mg/kg de metadona IV (12) e 2 mg/kg de tramadol IV (59).

Pode-se justificar o efeito antinociceptivo limitado dos opioides em situações experimentais pelo uso de modelos nociceptivos superficiais, já que a analgesia dos opioides ocorre principalmente em nível profundo. Esta seria uma possível limitação do modelo experimental adotado neste e em outros estudos, o que dificulta a aplicação dos resultados em situações de dor clínica (3). Modelos que estimulem as fibras C poderiam ser mais apropriados para estudar os efeitos analgésicos de opioides (60), o que foi confirmado neste estudo, dada a maior evidência de antinocicepção observada para o estímulo térmico em relação ao mecânico. Esta consideração é ratificada pelo fato que baixas doses de morfina em ratos agem apenas sobre as fibras A-delta e para ação em fibras C, se requer altas doses do fármaco (60, 61).

Já o estímulo elétrico ativa as fibras periféricas de forma inespecífica, mas basicamente, apresenta dois componentes que deflagram a dor, o primeiro por estímulo das fibras A-delta e o segundo por estímulo das fibras C. Como somente em doses altas os opioides inibem a transmissão da dor em fibras C (60, 61), além das fibras A delta, isto corrobora os resultados de nosso estudo, já que se observou um efeito antinociceptivo para o limiar elétrico na dose de 0,5 mg/kg de metadona IM e IV, mas não para a dose de 0,2 mg/kg (12).

Farmacocinética

As variáveis farmacocinéticas obtidas para a metadona estão de acordo com publicação prévia (8). No entanto, não observamos o perfil bifásico previamente relatado. Sabe-se que diferentes padrões de esvaziamento gástrico e motilidade intestinal afetam a concentração plasmática de fármacos, o que pode provocar

duplos picos (62). Em nosso estudo os animais não se alimentaram durante as seis horas de análise, mas não há informação no estudo anterior a este respeito.

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 (63, 64). Neste estudo observou-se grande variabilidade nas concentrações plasmáticas em todas as vias de administração, o que pode ser explicado por variáveis de transporte, biotransformação e genéticas (19).

Utilizaram-se menor número de pontos da curva em relação aos colhidos, para a escolha do modelo, o que não prejudicou os cálculos. Destaca-se que, mesmo ao se retirar momentos de amostragem, a porcentagem de extrapolação, que reflete o quanto a curva de eliminação teve que ser extrapolada até se obter o valor zero, foi menor que 20% em todos os casos, o que demonstra que a quantidade de amostras e tempo de amostragem foram suficientes para os cálculos farmacocinéticos.

Uma das vantagens da absorção na cavidade oral é prevenir a biotransformação de primeira passagem, além disso, o pH alcalino favorece a absorção da metadona, que é uma base fraca com um pK aproximado de 9,2. Os equinos apresentaram o pH oral entre oito e nove. Pode-se considerar que pelo menos parte da metadona foi absorvida na cavidade oral antes de alcançar a mucosa esofágica ou intestinal devido à intensa vascularização local (23, 43). Já o ambiente enteral possui vários fatores que diminuem a biodisponibilidade da metadona por esta via, que é de 30%, dentre eles: pH ácido em relação à cavidade oral, enzimas dos enterócitos e proteínas de membrana, como a GpP (8, 21, 43). Por esses fatores mesmo que tenha havido deglutição de uma porção considerável do conteúdo, a absorção entérica provavelmente foi pouco significativa para a biodisponibilidade do fármaco.

A concentração plasmática analgésica de metadona em seres humanos é em torno de 33 a 59 ng/mL (65). Em equinos Linardi *et al.* especulou que a doses de 0,1, 0,2 e 0,4 mg/kg por via O produziram C_{max} maiores que as concentrações reportadas em humanos e que, desta forma, esperaria-se efeito antinociceptivo (43),

especulação não confirmada em nosso estudo, já que não houve efeito antinociceptivo quando a metadona foi administrada por via O.

Os altos valores de biodisponibilidade aqui reportados após administração de metadona ON (106%) e O (135%) provavelmente se relacionam à absorção local. A veia jugular drena a via linguofacial proveniente da cavidade oral e desta forma, a concentração plasmática pode ser superestimada (66, 67). Apesar das amostras terem sido colhidas da veia jugular, tomou-se cuidado de se colher amostras da veia contralateral à administração de metadona O. Considerou-se colher amostras da veia torácica lateral, no entanto com a instrumentação necessária para obtenção dos dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos, necessitou-se cobrir a região lateral do tórax do animal, o que impossibilitou a colocação de um cateter nessa região. Os membros também não seriam uma possibilidade, pois após a administração IV, ocorreu aumento de atividade locomotora, que impediria a colheita das primeiras amostras, essenciais para a determinação do perfil farmacocinético da metadona.

A veia jugular é o lugar mais comum de amostragem sanguínea para estudos de farmacocinética em equinos (68-74), entretanto mais recentemente questiona-se esta via. Linardi *et al.* (43) também obtiveram valores de biodisponibilidade maior a 100% após a dose de 0,15 mg/kg de metadona O e os autores também se referem a possibilidade de absorção simultânea tanto na via transmucosa oral, quanto na enteral, mas dado ao baixo volume utilizado no estudo em discussão e no presente estudo (60 mL), parece improvável que este fenômeno seja possível. Messenger *et al.* (66) compararam as concentrações da buprenorfina administrada por via sublingual em equinos, em amostras sanguíneas das veias jugular e torácica lateral. Concluíram que a colheita da veia jugular não é apropriada para estudar a farmacocinética quando um fármaco apresenta absorção transmucosa oral, já que a biodisponibilidade foi maior que 100%, no entanto as concentrações ficaram abaixo do limite inferior de quantificação (10 ng/mL) quando utilizada a veia torácica lateral. Sohlberg *et al.* (75) compararam a absorção de um fármaco líquido via oral, quando colhidas amostras da veia jugular e safena. Observaram que os valores da veia jugular apresentavam maior variação, com o dobro da biodisponibilidade e concentrações máximas quatro vezes maiores aos encontrados na safena. Pypendop *et al.* compararam as concentrações plasmáticas da buprenorfina líquida

administrada por via oral em gatos (20 µg/kg), com colheitas na veia jugular, safena e artéria carótida. As maiores concentrações foram detectadas na jugular (6,3 ng/mL) comparado com a carótida (3,4 ng/mL) e a safena (2,5 ng/mL). A biodisponibilidade também foi superestimada quando medida na jugular (47%), se comparada com a carótida (32%) e safena (23%). Os pesquisadores concluíram que a veia jugular não é aceitável para estudos farmacocinéticos quando a absorção do fármaco é a transmucosa oral. No equino uma possível artéria a se acessar é a facial, no entanto se requer prática para canulação com o animal em posição quadrupedal, além do fato que neste estudo as colheitas eram realizadas a cada sete dias durante um mês (76).

Em ambas as formulações por via O não houve efeito antinociceptivo, mesmo com concentrações quase dez vezes superiores às concentrações de metadona consideradas analgésicas no homem (65). Outro fato intrigante é que se observou antinocicepção nos animais tratados com metadona IM em concentrações similares as atingidas após metadona O, onde não se observou antinocicepção. Deste achado surgem duas possíveis explicações: uma já abordada anteriormente se relaciona a inadequação da via de colheita das amostras sanguíneas após administração O, onde as concentrações plasmáticas estavam relacionadas ao local (jugular) e não espelhavam concentrações sistêmicas e outra é que no caso da administração IV e IM, atinge-se a concentração máxima rapidamente, já que após metadona IM o T_{max} foi aos 12,6 minutos e após metadona O, 28,6 minutos. A metadona atua sobre a GpP da BHE e além de ser substrato, inibe a glicoproteína de membrana, podendo altas concentrações, bloquear a proteína e viabilizar a passagem do fármaco ao SNC, para atingir os receptores OP3 (38).

Contrariamente à hipótese inicial, a formulação nanoparticulada apresentou perfil farmacocinético similar à injetável. As áreas sob a curva são parecidas e apesar da ausência de diferença estatística, o grupo que recebeu o cloridrato apresentou uma C_{max} maior e mais rápida, que o que recebeu a formulação nanoparticulada e a meia-vida tendeu a ser maior no grupo nanoparticulado dada a menor inclinação da curva. Estes resultados são opostos aos previamente relatados em que as nanopartículas aumentaram o efeito antinociceptivo de opioides (51-53). A formulação usada neste estudo diferia da injetável e inclusive tornou a molécula de

metadona mais lipossolúvel, o que em teoria também melhoraria sua passagem pelas membranas, aumentaria sua biodisponibilidade e presença em biofase, efeitos que não foram observados (41).

Uma possível explicação para os resultados discutidos anteriormente seria a possibilidade de haver uma concentração de metadona na solução nanoparticulada abaixo da prevista. Entretanto obteve-se a metadona base pela precipitação com bicarbonato de sódio, com posterior filtração e evaporação. Confirmou-se a ausência do cloridrato mediante espectrometria infravermelha. O pó obtido continha desta forma, somente metadona base, composto mais lipossolúvel que a injetável, a partir do qual prepararam-se as nanopartículas. Para a preparação da metadona nanoparticulada, pesou-se previamente em balança analítica, para solubilização nas manteigas de cacau e cupuaçu, passo onde em teoria não haveria perda do fármaco. No processo não parece ter havido alteração da molécula de metadona, já que o ponto de fusão da metadona é de 235 °C e a temperatura máxima atingida foi de 45 °C (77). A concentração final da formulação nanoparticulada não foi analisada, mas confia-se que a metodologia, a qual é utilizada no laboratório há anos, inclusive em escala industrial, é segura e que, a concentração final da formulação foi de 3 mg/mL.

Também avaliaram-se os parâmetros farmacocinéticos por cálculos para bioequivalência (WinNonlin®), onde o limite de confiança inferior foi abaixo do esperado, o que confirma que não eram bioequivalentes, no entanto, o limite superior de confiança ficou dentro do limite da bioequivalência e desta forma não se pode afirmar se as formulações foram ou não bioequivalentes. Estatisticamente não houve diferença entre os parâmetros farmacocinéticos, no entanto houve uma tendência das concentrações plasmáticas após a administração da formulação nanoparticulada serem menores que a formulação injetável administrada por via O. As concentrações de metadona apresentaram uma grande variabilidade inter-individual, já relatada anteriormente (8, 43), o que poderia prejudicar as análises estatísticas de bioequivalência e farmacocinética, na comparação entre as duas formulações.

Todos os parâmetros farmacocinéticos das diferentes vias se adaptaram ao modelo de um compartimento aberto, com eliminação de primeira ordem e de peso

dois. O modelo de um compartimento é o mais simples de todos e considera o organismo como homogêneo, ou seja, assume que o organismo elimina toda a dose do fármaco sempre com a mesma taxa (k_e). Neste modelo, o volume de distribuição seria o compartimento onde a dose se distribuiria instantaneamente. Assim, o V_d como estes se transforma em um fator proporcional entre a dose administrada e a concentração observada.

A metadona IV apresentou o mesmo perfil que o descrito na literatura, adaptando-se a um modelo de um compartimento com $t_{1/2}$ curta, rápida eliminação e distribuição restrita evidenciada por um pequeno V_d (8, 43). Como o volume de distribuição foi próximo de um, a meia-vida depende basicamente da depuração e como esta foi alta, a meia-vida foi curta e menor que uma hora em todos os indivíduos.

Observa-se que nos primeiros momentos de todos os grupos há um pequeno *plateau*, seguido por eliminação não linear. Este fenômeno poderia se relacionar a um perfil farmacocinético que se encaixa no modelo de *Michaelis-Menten*, com uma saturação do sistema. As causas para este fenômeno em animais saudáveis podem ser pela saturação da ligação às proteínas plasmáticas e sistemas de carreadores e enzimáticos (23). Não se descreveu este fenômeno em equinos na literatura consultada, no entanto a dose máxima que há disponibilidade de dados farmacocinéticos é de 0,4 mg/kg (8).

Quando se utiliza modelos lineares para análise farmacocinética, assume-se que os parâmetros farmacocinéticos não se alterarão quando se utilizam diferentes doses. O aumento da dose ou uso prolongado de alguns fármacos podem desviar o perfil linear para um não linear. Em geral, nestes casos a biotransformação se satura e ocorre secreção ativa pelos túbulos hepáticos. Para determinar se um fármaco segue um perfil não linear, também chamado de farmacocinética dose-dependente, o fármaco deve ser estudado em várias doses e deve-se obter uma curva plasmática para cada dose. A fórmula de *Michaelis-Menten* descreve estes perfis e inclui os valores de velocidade de eliminação máxima e a constante de *Michaelis* que reflete a capacidade do sistema enzimático (23). O presente estudo foi feito somente com uma dose, pois não havia a hipótese de se trabalhar com um fármaco de perfil não

linear e desta forma não é possível de se utilizar a fórmula de modelos não lineares. Já se planeja estudos futuros de nosso grupo para esclarecer este questionamento.

O maior TRM da metadona pela via IM em relação à IV pode-se relacionar à uma sobreposição da absorção com a eliminação, por conta de um depósito local do fármaco, provavelmente em consequência do alto volume injetado pela via IM, o qual foi de em torno de 17,5 mL. Isto amplia o tempo de circulação das moléculas do fármaco, porém do ponto de vista prático, pode-se considerar o TRM como curto. A administração IM de metadona causou efeito antinociceptivo, sem desencadear efeitos cardiovasculares ou gastrintestinais adversos, o que aparentemente torna esta via uma opção viável para equinos com quadros de dor e hipomotilidade intestinal, situação comum no período pós-operatório da espécie.

7. CONCLUSÃO

Independente da via de administração, a metadona apresenta um perfil farmacocinético de eliminação de primeira ordem e curta meia-vida, adaptando-se a um modelo de um compartimento.

Tanto a metadona administrada por via oral na forma injetável de cloridrato e nanoparticulada, apresentam perfil farmacocinético similar, entretanto sem efeito antinociceptivo.

A metadona administrada pelas vias IM e IV desencadeou efeito antinociceptivo predominantemente para estímulo térmico e elétrico.

Dada à excitação, ativação simpática e hipomotilidade intestinal observadas apenas após administração de metadona IV, a via IM é aparentemente mais segura para a espécie equina.

8. REFERÊNCIAS

1. LAMONT LA, MATHEWS KA. Opioids, nonsteroidal anti-inflammatories, and analgesic adjuvants. Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia. 4th ed. Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2007. p. 241- 71.
2. Clutton RE. Opioid analgesia in horses. Vet Clin North Am Equine Pract. 2010;26(3):493-514.
3. Figueiredo JP, Muir WW, Sams R. Cardiorespiratory, gastrointestinal, and analgesic effects of morphine sulfate in conscious healthy horses. Am J Vet Res. 2012;73(6):799-808.
4. Carregaro AB, Luna SP, Mataqueiro MI, de Queiroz-Neto A. Effects of buprenorphine on nociception and spontaneous locomotor activity in horses. Am J Vet Res. 2007;68(3):246-50.
5. Natalini CC. Spinal anesthetics and analgesics in the horse. Vet Clin North Am Equine Pract. 2010;26(3):551-64.
6. Natalini CC, Robinson EP. Evaluation of the analgesic effects of epidurally administered morphine, alfentanil, butorphanol, tramadol, and U50488H in horses. Am J Vet Res. 2000;61(12):1579-86.
7. Natalini CC, Robinson EP. Effects of epidural opioid analgesics on heart rate, arterial blood pressure, respiratory rate, body temperature, and behavior in horses. Vet Ther. 2003;4(4):364-75.
8. Linardi RL, Stokes AM, Barker SA, Short C, Hosgood G, Natalini CC. Pharmacokinetics of the injectable formulation of methadone hydrochloride administered orally in horses. J Vet Pharmacol Ther. 2009;32(5):492-7.
9. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. Pain Physician. 2008;11(2 Suppl):S133-53.
10. Sukhorukov GB, Rogach AL, Zebli B, Liedl T, Skirtach AG, Köhler K, et al. Nanoengineered polymer capsules: tools for detection, controlled delivery, and site-specific manipulation. Small. 2005;1(2):194-200.
11. Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. In: Brunton L, editor. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 th ed. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 547-90.
12. OLIVEIRA FA, PIGNATON W, TEIXEIRA-NETO FJ, QUEIROZ-NETO A, PUOLI-FILHO JNP, SCOGNAMILLO MVR, et al. Antinociceptive and Behavioral Effects of Methadone alone or in Combination with Detomidine in Conscious Horses. Journal of Equine Veterinary Science [Internet]. 2013; 33(33):[1-7 pp.]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613004693#>.
13. Santiago-Palma J, Khojainova N, Kornick C, Fischberg DJ, Primavera LH, Payne R, et al. Intravenous methadone in the management of chronic cancer pain: safe and effective starting doses when substituting methadone for fentanyl. Cancer. 2001;92(7):1919-25.
14. Inturrisi CE. Pharmacology of methadone and its isomers. Minerva Anesthesiol. 2005;71(7-8):435-7.
15. Shaiova L. The role of methadone in the treatment of moderate to severe cancer pain. Support Cancer Ther. 2005;2(3):176-80.
16. Codd EE, Shank RP, Schupsky JJ, Raffa RB. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. J Pharmacol Exp Ther. 1995;274(3):1263-70.
17. Pergolizzi J, Böger RH, Budd K, Dahan A, Erdine S, Hans G, et al. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). Pain Pract. 2008;8(4):287-313.
18. Bruera E, Sweeney C. Methadone use in cancer patients with pain: a review. J Palliat Med. 2002;5(1):127-38.
19. Li Y, Kantelip JP, Gerritsen-van Schieveen P, Davani S. Interindividual variability of methadone response: impact of genetic polymorphism. Mol Diagn Ther. 2008;12(2):109-24.
20. Olsen GD. Methadone binding to human plasma proteins. Clin Pharmacol Ther. 1973;14(3):338-43.

21. Linardi RL, Stokes AM, Andrews FM. The effect of P-glycoprotein on methadone hydrochloride flux in equine intestinal mucosa. *J Vet Pharmacol Ther.* 2013;36(1):43-50.
22. Lees P, Cunningham FM, Elliott J. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):397-414.
23. SHARGEL L, WU-PONG S, YU ABC. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*: McGraw Hill; 2012.
24. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. 2 nd. ed. New York: Informa Healthcare; 2007. 507 p.
25. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma clearance. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):415-25.
26. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):427-39.
27. RIVIERE JE, COPPOC GL, HINSMAN EJ, CARLTON WW, TRAVER DS. Species dependent gentamicin pharmacokinetics and nephrotoxicity in the young horse. *Fundamental and Applied Toxicology.* 1983;3(5):448-57.
28. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):441-53.
29. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):455-66.
30. PYPENDOP BH, editor Individual pharmacokinetics models. AVA Autumn Meeting; 2013; Moscow, Russia.
31. Toutain PL, Lees P. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(6):467-77.
32. Steagall PV, Pelligand L, Giordano T, Auburger C, Sear JW, Luna SP, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of intravenous, intramuscular and subcutaneous buprenorphine in conscious cats. *Vet Anaesth Analg.* 2013;40(1):83-95.
33. Kamerling SG, DeQuick DJ, Weckman TJ, Tobin T. Dose-related effects of fentanyl on autonomic and behavioral responses in performance horses. *Gen Pharmacol.* 1985;16(3):253-8.
34. Natalini CC, Polydoro AaS, Linardi RL. Analgesic effects of subarachnoidally administered hyperbaric opioids in horses. *Am J Vet Res.* 2006;67(6):941-6.
35. Love EJ, Murrell J, Whay HR. Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: a review. *Vet Anaesth Analg.* 2011;38(1):3-14.
36. Desmeules JA, Piguet V, Ehret GB, Dayer P. Pharmacogenetics, pharmacokinetics and analgesia. In: JS M, editor. *The Genetics of Pain*. Seattle: IASP Press; 2004. p. 211-37.
37. Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27(5):257-64.
38. Natalini CC, Da Cunha AF, Linardi RL. Multi-drug resistance gene (MDR1) and opioid analgesia in horses. *Ciência Rural [Internet]*. 2006; 36(Jan/Feb):[330-5 pp.].
39. Ieiri I, Takane H, Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(9):553-76.
40. Leibetseder EN, Mosing M, Jones RS. A comparison of extradural and intravenous methadone on intraoperative isoflurane and postoperative analgesia requirements in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2006;33(2):128-36.
41. REISFIELD GM, WILSON GR. *Rational use of sublingual opioids in palliative medicine*. <div data-canvas-width="19937067260837563" data-font-name="g_font_76_0" dir="ltr" style="font-size: 106667px; font-family: serif; left: 973333px; top: 450754px; transform: scale(109314, 1); transform-origin: 0% 0% 0px;">JOURNAL OF PALLIATIVE MEDICINE. 2007;10(2):465-75.
42. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci.* 1998;1(1):15-30.
43. Linardi RL, Stokes AM, Keowen ML, Barker SA, Hosgood GL, Short CR. Bioavailability and pharmacokinetics of oral and injectable formulations of methadone after intravenous, oral, and intragastric administration in horses. *Am J Vet Res.* 2012;73(2):290-5.

44. Kukanich B, Lascelles BD, Aman AM, Mealey KL, Papich MG. The effects of inhibiting cytochrome P450 3A, p-glycoprotein, and gastric acid secretion on the oral bioavailability of methadone in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005;28(5):461-6.
45. Little AA, Krotscheck U, Boothe DM, Erb HN. Pharmacokinetics of buccal mucosal administration of fentanyl in a carboxymethylcellulose gel compared with IV administration in dogs. *Vet Ther.* 2008;9(3):201-11.
46. Diaz del Consuelo I, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Ex vivo evaluation of bioadhesive films for buccal delivery of fentanyl. *J Control Release.* 2007;122(2):135-40.
47. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci.* 2003;6(2):252-73.
48. Tosi G, Vergoni AV, Ruozi B, Bondioli L, Badiali L, Rivasi F, et al. Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution. *J Control Release.* 2010;145(1):49-57.
49. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):161-77.
50. MARCATO PD. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia [Internet].* 2009; VI(2):[01-37 pp.].
51. Alyautdin RN, Petrov VE, Langer K, Berthold A, Kharkevich DA, Kreuter J. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm Res.* 1997;14(3):325-8.
52. Betbeder D, Spérandio S, Latapie JP, de Nadai J, Etienne A, Zajac JM, et al. Biovector nanoparticles improve antinociceptive efficacy of nasal morphine. *Pharm Res.* 2000;17(6):743-8.
53. Wang JJ, Liu KS, Sung KC, Tsai CY, Fang JY. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. *Eur J Pharm Sci.* 2009;38(2):138-46.
54. Hellyer PW, Bai L, Supon J, Quail C, Wagner AE, Mama KR, et al. Comparison of opioid and alpha-2 adrenergic receptor binding in horse and dog brain using radioligand autoradiography. *Vet Anaesth Analg.* 2003;30(3):172-82.
55. GIUDICE E, GIANNETTO C, CASELLA S, PICCIONE G. The Effect of Aerobic Exercise on Intraocular Pressure in Horse. *ACTA VET BRNO.* 2010;79:409-13.
56. Olsén L, Olsson K, Hydbring-Sandberg E, Bondesson U, Ingvast-Larsson C. Methadone in healthy goats - pharmacokinetics, behaviour and blood pressure. *Res Vet Sci.* 2013;95(1):231-7.
57. Carregaro AB, Neto FJ, Beier SL, Luna SP. Cardiopulmonary effects of buprenorphine in horses. *Am J Vet Res.* 2006;67(10):1675-80.
58. Love EJ, Taylor PM, Murrell J, Whay HR. Effects of acepromazine, butorphanol and buprenorphine on thermal and mechanical nociceptive thresholds in horses. *Equine Vet J.* 2012;44(2):221-5.
59. MILARÉ AS, OLIVEIRA FA, LUNA SPL, SCOGNAMILLO MVS, QUEIROZ AN. Intravenous Tramadol Injection has no Antinociceptive Effect in Horses Undergoing Electrical and Thermal Stimuli. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2013;33(10):823-6.
60. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53(4):597-652.
61. Jourdan D, Ardid D, Chapuy E, Le Bars D, Eschalier A. Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat. *Life Sci.* 1998;63(20):1761-8.
62. Oberle RL, Amidon GL. The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1987;15(5):529-44.
63. 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. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999;13(4):494-500.

64. Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(14):1153-93.
65. Gourlay GK, Willis RJ, Wilson PR. Postoperative pain control with methadone: influence of supplementary methadone doses and blood concentration--response relationships. *Anesthesiology.* 1984;61(1):19-26.
66. Messenger KM, Davis JL, LaFevers DH, Barlow BM, Posner LP. Intravenous and sublingual buprenorphine in horses: pharmacokinetics and influence of sampling site. *Vet Anaesth Analg.* 2011;38(4):374-84.
67. DYCE KM, SACK WO, WENSING CJG. *Textbook of Veterinary Anatomy.* 4 ED. ed. Missouri: Elsevier; 2009.
68. Bäumer W, Herrling GM, Feige K. Pharmacokinetics and thrombolytic effects of the recombinant tissue-type plasminogen activator in horses. *BMC Vet Res.* 2013;9(1):158.
69. Mullen KR, Schwark W, Divers TJ. Pharmacokinetics of single-dose intragastric and intravenous pregabalin administration in clinically normal horses. *Am J Vet Res.* 2013;74(7):1043-8.
70. Nieto JE, Maher O, Stanley SD, Knych HK, Snyder JR. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of zoledronic acid in horses. *Am J Vet Res.* 2013;74(4):550-6.
71. Zozaya H, Gutierrez L, Bernad MJ, Sumano H. Pharmacokinetics of a peroral single dose of two long-acting formulations and an aqueous formulation of doxycycline hyclate in horses. *Acta Vet Scand.* 2013;55:21.
72. Kuroda T, Nagata S, Takizawa Y, Tamura N, Kusano K, Mizobe F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of d-chlorpheniramine following intravenous and oral administration in healthy Thoroughbred horses. *Vet J.* 2013;197(2):433-7.
73. Hubbell JA, Kelly EM, Aarnes TK, Bednarski RM, Lerche P, Liu Z, et al. Pharmacokinetics of midazolam after intravenous administration to horses. *Equine Vet J.* 2013;45(6):721-5.
74. Vainionpää MH, Raekallio MR, Pakkanen SA, Ranta-Panula V, Rinne VM, Scheinin M, et al. Plasma drug concentrations and clinical effects of a peripheral alpha-2-adrenoceptor antagonist, MK-467, in horses sedated with detomidine. *Vet Anaesth Analg.* 2013;40(3):257-64.
75. Sohlberg E, Halldin MM, Annas A, Königsson K, Jansson B, Pehrson R, et al. The impact of the site of blood sampling on pharmacokinetic parameters following sublingual dosing to dogs. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013;67(1):1-4.
76. Hedges AR, Pypendop BH, Shilo Y, Stanley SD, Ilkiw JE. Impact of the blood sampling site on time?concentration drug profiles following intravenous or buccal drug administration

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics Early View. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics [Internet]. 2013 01:[n/a p.]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12075/abstract>.

77. **Methadone - Compound Summary** (CID 4095) [Internet]. Available from: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4095#x321>.

9 APÊNDICE

APÊNDICE I - Valores no grupo IV para todos os animais em todos os tempos dos parâmetros farmacocinéticos: pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), escala de 0 a 16 para os movimentos intestinais (MI), limiar mecânico em joules, diferença entre a temperatura da pele e de retirada do membro para o limiar térmico em °C e limiar elétrico (volts).

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Esquecida	IV	basal	118	44	12	13	2,8	20,2	6
Esquecida	IV	10	192	80	16	0	20	28	
Esquecida	IV	20							
Esquecida	IV	45	186	64	32	0	20	20,3	28
Esquecida	IV	60	162	52	28	8	20	26,6	11
Esquecida	IV	80	138	52	28	8	20	26,5	12
Esquecida	IV	100	158	48	32	10	20	26,7	16
Esquecida	IV	120	126	42	18	11	20	23,9	11
Esquecida	IV	140	124	44	24	12	20	27,4	10
Esquecida	IV	160	120	44	16	13	20	27,4	9
Esquecida	IV	180	112	40	16	14	17,4	26,9	9
Esquecida	IV	210	122	44	12	12	2,3	24,1	5
Esquecida	IV	240	110	42	16	13	5,5	26,4	7
Marjory	IV	basal	128	46	12	14	1,5	14,4	2
Marjory	IV	10	240	68		0	20	26,7	10
Marjory	IV	20	216	64	14	0	20	26,8	10
Marjory	IV	45	188	60	16	11	20	26,9	10
Marjory	IV	60	192	60	20	13	20	26,1	6
Marjory	IV	80	188	52	32	13	20	18,7	6
Marjory	IV	100	166	52	24	14	6	17	6
Marjory	IV	120	152	52	24	11	0,8	18,6	4
Marjory	IV	140	136	52	30	12	8,6	21,1	4
Marjory	IV	160	156	52	20	13	13,8	12,7	4
Marjory	IV	180	100	48	20	14	1,1	13,8	7
Marjory	IV	210	95	50	20	14	1,1	11,1	4
Marjory	IV	240	100	52	20	15	3,1	12,6	3
Mogiana	IV	basal	104	40	20	15	7,7	23,8	5
Mogiana	IV	10		68					
Mogiana	IV	20	280	56			20		22
Mogiana	IV	45	240	56		11	20		22
Mogiana	IV	60	150	60		9	20	23,8	14
Mogiana	IV	80	154	56		12	19,5	25,1	20
Mogiana	IV	100	130	52	44	13	17,7		14
Mogiana	IV	120	128	44	30	13	20		12
Mogiana	IV	140	120	40	36	15	10,9		12
Mogiana	IV	160	126	40	18	16	20	0	12
Mogiana	IV	180	120	40	16	15	5,5	0	12
Mogiana	IV	210	132	40	16	16	1,6	0	9
Mogiana	IV	240	124	40	16	16	4,1	0	8

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Planeta	IV	basal	122	48	16	14	1	21,7	1
Planeta	IV	10	240	52					
Planeta	IV	20	210	60			15,9	33,8	5
Planeta	IV	45	210	56		8	7,7	33,8	4
Planeta	IV	60	164	60		8	5,5	26,5	4
Planeta	IV	80	148	64		13	4,2	27,7	3
Planeta	IV	100	128	64	16	15	2,8	24,4	3
Planeta	IV	120	118	60	22	15	1,6	25	3
Planeta	IV	140	122	60	24	15	2,6	24,3	2
Planeta	IV	160	116	64	16	15	1,7	22,8	2
Planeta	IV	180	114	60	16	15	0,6	23	3
Planeta	IV	210	118	60	16	15	1,9	20,6	3
Planeta	IV	240	124	60	16	15	0,7	18,2	2
Turquesa	IV	basal	112	48	18	16	2,7	13,5	2
Turquesa	IV	10	230	67	30		10,2	28,6	4
Turquesa	IV	20	240	60	24		11,3	28,3	5
Turquesa	IV	45	180	48		10	10,5	23,4	5
Turquesa	IV	60	178	52	18	9	8,2	27,3	3
Turquesa	IV	80	168	48	24	15	5,2	27,3	3
Turquesa	IV	100	160	48	18	14	6	27	5
Turquesa	IV	120	128	48	16	13	3,2	17,6	4
Turquesa	IV	140	132	44	16	15	11,4	26,6	3
Turquesa	IV	160	136	48	14	14	2,1	13,7	6
Turquesa	IV	180	138	44	14	15	2,3	22	3
Turquesa	IV	210	122	44	16	16	1,5	12,8	3
Turquesa	IV	240	108	42	20	16	4,6	12	5
Zaira	IV	basal	116	46	12	14	11,3	15	6
Zaira	IV	10	220	80	16	0	20	28,3	18
Zaira	IV	20	238	64	16	12	20	27,5	20
Zaira	IV	45	218	60	16	9	20	27,3	16
Zaira	IV	60	228	60	12	12	17,3	27	18
Zaira	IV	80	180	54	18	12	11,1	16,1	16
Zaira	IV	100	154	52	14	13	20	17,1	12
Zaira	IV	120	174	52	16	15	19,4	23,7	10
Zaira	IV	140	160	48	18	13	15,7	16,2	12
Zaira	IV	160	150	48	16	14	18,7	14	7
Zaira	IV	180	134	44	10	15	19,7	16,5	12
Zaira	IV	210	142	46	12	15	7,3	16,7	7
Zaira	IV	240	142	44	10	14	5,9	18,2	7

APÊNDICE II - Valores no grupo IM para todos os animais em todos os tempos dos parâmetros farmacocinéticos: pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), escala de 0 a 16 para os movimentos intestinais (MI), limiar mecânico em joules, diferença entre a temperatura da pele e de retirada do membro para o limiar térmico em °C e limiar elétrico (volts).

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Esquecida	IM	basal	110	44	10	12	6,3	15,9	4
Esquecida	IM	10	136	38	12	12	6,9	14,3	3
Esquecida	IM	20	138	40	12	10	12,4	19,6	8
Esquecida	IM	45	130	52	12	10	11,5	23,4	8
Esquecida	IM	60	140	44	12	12	11,6	25,9	7
Esquecida	IM	80	140	46	13	11	5,2	26,5	8
Esquecida	IM	100	134	42	16	12	5,3	26,09	8
Esquecida	IM	120	120	36	16	10	5,6	18,5	7
Esquecida	IM	140	140	40	12	10	3,4	17,2	6
Esquecida	IM	160	118	42	12	12	7,9	19,9	5
Esquecida	IM	180	122	40	10	12	5,9	21	6
Esquecida	IM	210	118	38	14	13	2,6	21,8	4
Esquecida	IM	240	110	38	16	13	5,9	20,8	4
Marjory	IM	basal	140	44	16	16	2,1	18,8	2
Marjory	IM	10	138	48	12	12	8	21,1	6
Marjory	IM	20	140	40	8	11	11,4	22,7	7
Marjory	IM	45	140	42	8	12	15,5	20,8	5
Marjory	IM	60	158	50	12	12	9,4	23,8	6
Marjory	IM	80	136	50	12	13	7	24,8	6
Marjory	IM	100	148	42	12	14	5,8	23,7	5
Marjory	IM	120	140	48	10	16	5,9	22,7	6
Marjory	IM	140	138	48	12	15	2,5	22,3	3
Marjory	IM	160	146	50	12	14	1,3	21,6	5
Marjory	IM	180	134	52	12	14	2,6	24,4	5
Marjory	IM	210	126	52	16	15	5,8	22,6	4
Marjory	IM	240	124	48	16	15	6,6	22,8	5
Mogiana	IM	basal	120	36	16	15	4,1	12	5
Mogiana	IM	10	124	38	14	15	7,8	14,6	7
Mogiana	IM	20	134	38	12	14	17,3	16,1	10
Mogiana	IM	45	134	40	12	15	13,5	12	8
Mogiana	IM	60	134	38	10	14	16	16,5	9
Mogiana	IM	80	138	40	14	15	4,9	18,5	12
Mogiana	IM	100	132	40	12	15	1,7	17,2	12
Mogiana	IM	120	140	38	12	14	4,3	19,3	11
Mogiana	IM	140	130	38	12	14	12,4	20,8	11
Mogiana	IM	160	138	40	14	14	6	12,5	9
Mogiana	IM	180	138	38	12	13	8	13,2	9
Mogiana	IM	210	130	38	10	15	4,8	10,4	8
Mogiana	IM	240	128	38	12	14	6,6	16,8	10

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Planeta	IM	basal	118	42	16	15	0,8	12,3	1
Planeta	IM	10	152	60	10	12	6,3	7,2	2
Planeta	IM	20	136	60	12	11	1	24,9	2
Planeta	IM	45	132	64	12	9	1,1	24,6	2
Planeta	IM	60	132	68	12	11	0,9	22,4	2
Planeta	IM	80	120	68	10	14	1	15,2	2
Planeta	IM	100	120	68	12	13	5,7	11,9	2
Planeta	IM	120	116	68	16	14	1	9,6	2
Planeta	IM	140	128	76	14	13	0,6	9,9	2
Planeta	IM	160	126	70	14	14	0,8	8,9	2
Planeta	IM	180	122	68	14	15	0,8	9,1	2
Planeta	IM	210	112	70	14	15	0,6	8,7	2
Planeta	IM	240	108	70	12	14	1	7,5	2
Turquesa	IM	basal	110	40	18	13	3,5	15,5	3
Turquesa	IM	10	136	40	12	15	3,4	16,4	3
Turquesa	IM	20	136	46	18	13	4,5	18,5	5
Turquesa	IM	45	140	42	16	10	1	12,7	4
Turquesa	IM	60	142	44	16	12	2,2	16,3	5
Turquesa	IM	80	138	42	18	12	1,2	20,3	3
Turquesa	IM	100	130	40	20	14	1,3	17,6	4
Turquesa	IM	120	122	44	18	14	2,1	15	3
Turquesa	IM	140	118	40	16	15	0,4	17,8	4
Turquesa	IM	160	122	42	16	13	0,7	12,1	3
Turquesa	IM	180	118	40	18	14	0,4	7,9	1
Turquesa	IM	210	112	40	14	14	0,7	19,2	3
Turquesa	IM	240	110	42	18	14	0,9	7,4	2
Zaira	IM	basal	148	46	20	16	8,2	18,9	5
Zaira	IM	10	166	52	12	11	18,2	22	12
Zaira	IM	20	148	48	12	12	20	14,3	12
Zaira	IM	45	160	48	16	12	20	21	12
Zaira	IM	60	180	44	12	12	20	19,8	10
Zaira	IM	80	164	54	12	14	20	20,4	12
Zaira	IM	100	180	52	12	12	17,5	22,8	9
Zaira	IM	120	148	48	16	16	11	22,3	9
Zaira	IM	140	166	52	12	15	19	22,2	9
Zaira	IM	160	156	48	16	15	7,88	22,8	8
Zaira	IM	180	140	48	14	14	14,1	19,8	9
Zaira	IM	210	124	40	14	15	3,5	23,7	9
Zaira	IM	240	138	44	12	16	6,6	27,5	8

APÊNDICE III - Valores no grupo metadona oral para todos os animais em todos os tempos dos parâmetros farmacocinéticos: pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), escala de 0 a 16 para os movimentos intestinais (MI), limiar mecânico em joules, diferença entre a temperatura da pele e de retirada do membro para o limiar térmico em °C e limiar elétrico (volts).

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Esquecida	ORAL	basal	108	40	16	14	7,6	35,8	3
Esquecida	ORAL	10	106	36	12	16	3,6	28,5	3
Esquecida	ORAL	20	108	36	12	16	5,2	34,4	4
Esquecida	ORAL	45	110	34	12	15	9,1	31	3
Esquecida	ORAL	60	114	36	10	15	7,5	26	4
Esquecida	ORAL	80	110	40	12	13	6,6	24,9	3
Esquecida	ORAL	100	122	34	10	14	4,9	26,5	3
Esquecida	ORAL	120	120	36	12	16	7,2	29,3	3
Esquecida	ORAL	140	128	36	12	15	10,2	28,8	5
Esquecida	ORAL	160	118	34	12	15	9,7	25,9	4
Esquecida	ORAL	180	114	38	12	15	4,8	27,7	4
Esquecida	ORAL	210	108	34	12	15	2	22,4	3
Esquecida	ORAL	240	126	36	12	15	4,8	24,8	5
Marjory	ORAL	basal	150	48	12	15	6,7	26,7	3
Marjory	ORAL	10	146	52	16	16	5,6	25	3
Marjory	ORAL	20	140	44	16	16	6,1	26,6	3
Marjory	ORAL	45	146	48	16	15	11,3	24	3
Marjory	ORAL	60	168	46	16	15	8,4	26,7	5
Marjory	ORAL	80	154	44	16	13	8,6	12,8	5
Marjory	ORAL	100	148	48	18	11	6,9	26,8	5
Marjory	ORAL	120	154	52	16	14	4,2	26,6	4
Marjory	ORAL	140	152	44	18	15	4,8	27	5
Marjory	ORAL	160	148	48	16	14	4,1	26,7	4
Marjory	ORAL	180	156	52	16	14	3,8	25,4	5
Marjory	ORAL	210	150	48	16	15	2,8	22,2	2
Marjory	ORAL	240	144	52	18	16	6	11,6	3
Mogiana	ORAL	basal	118	40	16	14	6,6	18,7	6
Mogiana	ORAL	10	136	40	12	14	8,5	16,8	9
Mogiana	ORAL	20	126	40	16	15	20	18,8	10
Mogiana	ORAL	45	138	38	12	15	20	21,2	7
Mogiana	ORAL	60	150	40	12	15	20	22,7	6
Mogiana	ORAL	80	136	38	12	15	12	24,9	10
Mogiana	ORAL	100	144	40	12	15	7	16,1	6
Mogiana	ORAL	120	150	38	12	15	14,7	23,5	10
Mogiana	ORAL	140	132	36	16	15	9,7	24,5	7
Mogiana	ORAL	160	152	42	14	13	10,8	22,4	12
Mogiana	ORAL	180	148	40	14	15	1,2	18,3	5
Mogiana	ORAL	210	138	36	16	15	5,1	12,7	8
Mogiana	ORAL	240	144	36	10	15	3,9	14,9	6

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Planeta	ORAL	basal	112	42	14	14	5,7	28,4	2
Planeta	ORAL	10	106	48	12	11	7,3	29,4	2
Planeta	ORAL	20	112	40	14	12	3,3	29,7	3
Planeta	ORAL	45	106	52	10	12	5,3	21,5	3
Planeta	ORAL	60	96	56	10	12	3,8	16,5	3
Planeta	ORAL	80	92	48	8	12	4,1	14,8	4
Planeta	ORAL	100	102	56	10	11	1,6	16,3	3
Planeta	ORAL	120	88	44	10	11	5,9	19,6	3
Planeta	ORAL	140	92	48	10	12	2,7	19,1	3
Planeta	ORAL	160	96	48	12	13	3,3	18,8	3
Planeta	ORAL	180	90	52	10	15	3	20,9	4
Planeta	ORAL	210	100	48	12	14	1,9	13,7	2
Planeta	ORAL	240	98	56	12	13	3,3	9,6	4
Turquesa	ORAL	basal	116	44	24	15	5,6	10,3	3
Turquesa	ORAL	10	112	40	24	15	0,9	15,2	3
Turquesa	ORAL	20	128	42	24	15	5,5	12,9	3
Turquesa	ORAL	45	124	40	20	12	0,4	11,2	3
Turquesa	ORAL	60	140	40	24	15	0,7	10,7	2
Turquesa	ORAL	80	118	42	24	15	0,5	9,1	2
Turquesa	ORAL	100	130	40	20	15	1	7,2	2
Turquesa	ORAL	120	106	42	20	14	1,1	7,1	1
Turquesa	ORAL	140	120	40	20	15	4,1	10,2	2
Turquesa	ORAL	160	116	42	24	15	1,1	9,3	2
Turquesa	ORAL	180	120	42	24	14	3,3	14,1	3
Turquesa	ORAL	210	118	42	16	14	2,7	13,5	2
Turquesa	ORAL	240	122	40	20	15	0,7	10,6	2
Zaira	ORAL	basal	128	44	14	14	4,8	11,8	3
Zaira	ORAL	10	162	40	12	14	6,2	10,3	2
Zaira	ORAL	20	156	42	12	14	13,3	10,3	3
Zaira	ORAL	45	162	44	12	14	11,5	12,2	5
Zaira	ORAL	60	158	40	10	15	1,8	13,8	3
Zaira	ORAL	80	174	42	10	14	12,6	13,7	4
Zaira	ORAL	100	164	44	8	15	14,7	12,4	4
Zaira	ORAL	120	160	44	10	14	5,1	13,6	4
Zaira	ORAL	140	176	42	10	15	3,1	15,7	5
Zaira	ORAL	160	164	42	10	14	6,6	9,7	6
Zaira	ORAL	180	164	42	12	14	6,8	9,6	4
Zaira	ORAL	210	150	40	12	14	5,3	8,6	4
Zaira	ORAL	240	152	40	10	13	7,9	7,4	4

APÊNDICE IV - Valores no grupo metadona nanoparticulada oral para todos os animais em todos os tempos dos parâmetros farmacocinéticos: pressão arterial sistólica (PAS), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), escala de 0 a 16 para os movimentos intestinais (MI), limiar mecânico em joules, diferença entre a temperatura da pele e de retirada do membro para o limiar térmico em °C e limiar elétrico (volts).

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Esquecida	NANO	basal	128	44	14	12	3,9	14,8	4
Esquecida	NANO	10	108	44	14	13	5,7	13	3
Esquecida	NANO	20	116	42	12	12	9,6	18,8	3
Esquecida	NANO	45	122	40	10	12	7,9	12,9	5
Esquecida	NANO	60	118	40	10	13	10,5	14,3	5
Esquecida	NANO	80	118	42	12	14	6,1	12,5	6
Esquecida	NANO	100	122	40	10	13	8,3	16,4	5
Esquecida	NANO	120	120	44	12	13	4,2	18,4	4
Esquecida	NANO	140	118	42	14	12	9	20,7	4
Esquecida	NANO	160	116	40	12	13	6,9	22,2	5
Esquecida	NANO	180	124	36	8	13	4,1	18,5	4
Esquecida	NANO	210	118	38	10	12	7,1	16,4	5
Esquecida	NANO	240	118	38	10	12	3,3	18,7	4
Marjory	NANO	basal	128	48	12	15	2,2	14,3	2
Marjory	NANO	10	146	52	16	15	2,4	16,6	2
Marjory	NANO	20	132	50	16	14	0,5	21	2
Marjory	NANO	45	138	56	14	14	5	21,2	2
Marjory	NANO	60	128	52	16	15	5,6	13,4	2
Marjory	NANO	80	146	52	12	15	1	11,3	2
Marjory	NANO	100	142	52	12	15	1	9,8	2
Marjory	NANO	120	128	52	14	15	0,6	10,7	1
Marjory	NANO	140	132	56	12	15	6,6	13,6	1
Marjory	NANO	160	126	56	12	15	2,7	15,2	2
Marjory	NANO	180	128	54	13	14	4,5	14,3	2
Marjory	NANO	210	122	58	12	14	3,7	12,7	2
Marjory	NANO	240	114	62	12	15	2	9,9	2
Mogiana	NANO	basal	118	44	14	14	1,3	15	7
Mogiana	NANO	10	126	40	16	13	3	17,8	6
Mogiana	NANO	20	122	38	14	14	14,5	15,2	5
Mogiana	NANO	45	132	38	12	12	11	15,3	6
Mogiana	NANO	60	132	38	14	14	5,4	16,7	5
Mogiana	NANO	80	134	40	12	14	12,7	15,3	7
Mogiana	NANO	100	128	40	12	14	8,7	21,4	11
Mogiana	NANO	120	124	36	12	12	4,5	19,8	8
Mogiana	NANO	140	132	38	12	12	16,3	18,6	11
Mogiana	NANO	160	124	40	10	14	14,6	19,8	11
Mogiana	NANO	180	126	38	12	13	5,6	17	11
Mogiana	NANO	210	124	38	14	14	10,6	16,8	11
Mogiana	NANO	240	122	38	12	14	6,3	13,7	11

Identificação	Grupo	Momento (min)	PAS	FC	fr	MI	Limiar Mecânico	Limiar Térmico	Limiar Elétrico
Planeta	NANO	basal	104	64	12	14	3	14,5	1
Planeta	NANO	10	116	64	12	11	6,4	11,7	2
Planeta	NANO	20	120	66	16	11	2,8	11,5	2
Planeta	NANO	45	108	66	16	10	4,9	10,1	2
Planeta	NANO	60	106	66	12	12	6,7	11,9	2
Planeta	NANO	80	120	64	14	11	0,8	11,7	1
Planeta	NANO	100	116	62	14	12	0,6	11,7	2
Planeta	NANO	120	106	64	10	11	2,4	12	2
Planeta	NANO	140	110	64	12	11	0,7	12,1	2
Planeta	NANO	160	108	64	12	15	1,7	11,7	1
Planeta	NANO	180	106	64	16	14	1	11,7	2
Planeta	NANO	210	104	64	16	14	0,9	12	2
Planeta	NANO	240	108	64	16	15	0,2	11,3	2
Turquesa	NANO	basal	118	48	16	15	6,8	10,8	2
Turquesa	NANO	10	124	42	18	13	1,9	7,6	3
Turquesa	NANO	20	120	44	16	15	5,2	13,6	2
Turquesa	NANO	45	102	42	14	13	5,7	13,2	3
Turquesa	NANO	60	116	42	16	15	8,6	16,8	3
Turquesa	NANO	80	116	40	12	14	0,6	14,8	1
Turquesa	NANO	100	108	42	16	14	0,7	14,8	3
Turquesa	NANO	120	112	40	12	14	0,4	15,2	3
Turquesa	NANO	140	116	40	12	13	1	11,9	2
Turquesa	NANO	160	118	40	16	13	0,6	5,6	2
Turquesa	NANO	180	120	40	16	13	1,2	13,1	3
Turquesa	NANO	210	116	40	14	15	2	12,4	3
Turquesa	NANO	240	114	40	14	14	0,6	16,7	2
Zaira	NANO	basal	118	44	16	13	5,8	15,7	2
Zaira	NANO	10	152	44	12	15	1,3	12,8	3
Zaira	NANO	20	152	44	12	15	5,7	13,9	2
Zaira	NANO	45	114	42	10	14	8,6	15,7	3
Zaira	NANO	60	118	44	12	13	11,8	16,6	3
Zaira	NANO	80	118	40	8	13	19,4	17	7
Zaira	NANO	100	126	48	14	13	15,1	16,6	7
Zaira	NANO	120	116	50	12	14	20	18	7
Zaira	NANO	140	128	48	12	14	12,9	19,8	7
Zaira	NANO	160	126	44	12	13	13,1	11,9	6
Zaira	NANO	180	128	52	14	13	14,8	11,9	6
Zaira	NANO	210	110	48	12	13	8,2	15,9	6
Zaira	NANO	240	120	52	10	14	4,3	12,8	6

APÊNDICE VI - Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) para o grupo IM ao longo do tempo.

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	Media	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	208,5	215,4	421,8	286,8	226,1	326,7	280,9	83,1
5	235,1	228,1	377,6	288,4	260,9	336,3	287,7	59,1
10	234,9	250,4	418,0	317,2	262,2	374,6	309,6	74,0
15	225,8	282,6	476,5	280,9	246,8	407,2	320,0	99,3
20	230,6	233,0	361,7	306,9	207,2	439,6	296,5	90,8
30	191,3	223,6	368,4	261,9	211,4	353,5	268,3	75,5
45	194,6	139,0	275,2	244,7	202,7	311,9	228,0	62,0
60	213,9	161,4	202,1	253,6	191,8	264,7	214,6	38,8
80	186,2	176,9	197,9	275,8	212,4	234,5	213,9	36,5
100	148,3	135,4	117,1	166,6	151,8	174,8	149,0	20,9
120	157,0	134,8	107,8	152,0	109,8	143,8	134,2	21,1
140	112,1	104,0	93,6	99,9	81,3	86,5	96,2	11,4
160	93,6	104,3	73,2	107,2	72,7	64,5	85,9	18,1
180	76,5	101,7	50,8	102,1	50,3	38,5	70,0	27,7
210	39,8	69,1	23,6	72,9	46,0	38,0	44,2	19,1
240	48,7	45,6	7,6	41,1	40,3	ILQ	47,1	19,7
270	39,4	40,0	ILQ	21,2	32,4	ILQ	33,3	8,7
300	15,9	21,5	ILQ	19,9	14,1	ILQ	17,8	ILQ
330	14,0	17,6	ILQ	20,6	12,7	ILQ	16,2	ILQ
360	12,8	14,7	ILQ	7,7	ILQ	ILQ	11,7	ILQ

APÊNDICE VII - Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) para o grupo Oral ao longo do tempo.

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	Media	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	38,4	114,7	63,3	56,3	49,9	268,1	98,5	87,2
5	41,6	159,9	118,8	91,5	133,7	346,6	148,7	105,0
10	122,3	176,3	115,2	96,1	185,3	390,3	180,9	108,5
15	139,5	221,1	102,4	117,3	196,2	372,3	191,5	99,7
20	160,6	238,9	264,5	194,0	155,3	499,2	252,1	128,4
30	309,2	354,1	390,6	155,9	128,8	387,0	287,6	116,6
45	202,9	333,6	156,5	258,2	113,4	370,3	239,1	100,4
60	103,0	209,3	155,1	211,9	129,0	322,7	188,5	78,7
80	131,2	235,3	124,8	149,7	327,3	267,2	205,9	83,3
100	102,7	152,9	132,1	169,4	204,0	223,2	164,1	44,8
120	110,5	170,5	79,8	123,9	134,0	198,1	136,1	42,4
140	74,9	162,7	79,0	101,9	154,3	146,8	119,9	39,4
160	73,9	105,1	58,2	107,1	179,9	69,8	99,0	44,3
180	81,2	103,1	49,4	83,8	122,0	113,1	92,1	26,4
210	82,0	81,2	46,2	67,4	125,3	100,6	69,8	27,2
240	29,1	73,5	32,2	54,1	61,2	73,9	51,3	19,6
270	23,9	46,8	15,8	35,0	56,4	55,7	38,9	16,9
300	19,3	47,3	10,8	31,1	44,6	31,0	30,7	14,1
330	17,2	36,9	ILQ	22,0	39,9	27,7	28,7	9,6
360	10,7	17,3	ILQ	10,8	ILQ	14,7	13,4	ILQ

APÊNDICE VIII - Concentrações plasmáticas individuais (ng/mL) para o grupo Nanopartículas ao longo do tempo

Tempo	Esquecida	Marjory	Mogiana	Planeta	Turquesa	Zaira	Media	DP
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	151,6	123,5	85,6	29,4	102,4	49,6	90,3	45,6
5	152,8	138,7	120,6	46,6	152,7	49,6	110,1	49,5
10	182,6	146,5	152,0	50,7	168,7	83,8	130,7	51,9
15	189,3	205,8	197,2	88,2	170,3	118,3	161,5	47,6
20	207,2	187,0	232,1	124,9	142,9	112,3	167,7	48,2
30	184,4	185,5	212,2	103,6	180,0	99,1	160,8	47,4
45	169,2	182,2	262,1	95,6	160,7	210,7	180,1	55,3
60	153,6	269,0	280,5	98,5	86,8	188,7	179,5	82,6
80	132,0	202,9	240,4	82,4	60,2	144,1	143,7	68,9
100	107,2	126,8	202,3	97,2	81,5	96,1	118,5	43,7
120	97,2	110,3	176,7	114,1	41,8	104,3	107,4	43,1
140	113,4	145,2	176,2	72,4	36,2	109,6	108,8	50,0
160	118,6	90,0	146,9	51,4	34,2	80,8	87,0	41,7
180	58,1	96,9	152,9	75,7	27,0	62,2	78,8	42,9
210	60,4	89,4	83,6	72,8	30,9	50,2	77,8	21,9
240	49,2	59,9	75,3	35,2	23,5	32,9	54,5	19,3
270	48,4	44,7	79,1	23,5	10,8	39,4	41,0	23,4
300	30,4	39,3	45,3	13,4	9,7	21,0	26,5	14,3
330	26,0	26,2	21,1	5,7	5,2	14,4	16,4	9,6
360	21,5	25,5	15,2	ILQ	ILQ	13,6	19,0	5,5