

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**“ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA CETAMINA S(+)
ASSOCIADA OU NÃO AO MIDAZOLAM, EM CÃES.”**

Pós-Graduando: Alessandro Galhardo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosângela G. P. Machado

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias–
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Cirurgia Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Agosto de 2007

Galhardo, Alessandro
G155a Aspectos farmacológicos da cetamina S(+) associada ou não ao
midazolam, em cães / Alessandro Galhardo – – Jaboticabal, 2007
xvii, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão
Banca examinadora: Newton Nunes, José Francisco Fracasso
Bibliografia

1. Farmacologia. 2. Cetamina S(+). 3. Midazolam. 4. Cães. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.111:599.324

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRO GALHARDO - nasceu em Araraquara - SP, no dia 02 de Janeiro de 1973. Filho de Francisco Galhardo Filho e Thereza Paulo de Faria Galhardo, tornou-se graduado em Medicina Veterinária no ano de 1998, pela Universidade de Pinhal – UNIPINHAL em Espírito Santo do Pinhal - SP. Especializou-se em Saúde Pública no ano de 1999, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara - SP. Especializou-se em Clínica e Cirurgia Veterinária de pequenos animais no ano de 2001 , pela Universidade da Fundação de Ensino Octávio Bastos – UNIFEOB em São João da Boa Vista - SP. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal – SP em 2005.

Dedico e Ofereço

Aos meus pais Francisco e Thereza pela educação, amor e carinho que sempre me deram.

Aos meus sobrinhos Leonardo, Marcella, Letícia e Manoel por sempre alegrar minha vida.

Aos meus irmãos Vladimir, Marcelo e Daniela pelo apoio e amizade.

A namorada Flávia, que graças a sua dedicação, seu amor e sua paciência, consegui terminar esta dissertação.

Ao amigo, professor e orientador Carlos Augusto Araújo Valadão pela confiança, paciência e seus ensinamentos .

A minha co-orientadora , amiga e professora Rosângela Peccinini Machado por toda a sua dedicação e carinho.

A toda família Roberto e Laura Dela Coleta pelo apoio, incentivo e também pelos rangos oferecidos, durante todo este tempo .

Agradeco

Á Deus por cada instante vivido...

A pós-graduação por permitir que eu realizasse o mestrado.

Aos professores Newton Nunes e Antonio de Queiroz Neto, pela composição da banca de qualificação e pelas considerações feitas sobre este trabalho.

Aos professores José Francisco Fracasso e Newton Nunes pela composição da banca de defesa.

Aos amigos e vizinhos Richard Feres, Márcia Sampaio, Paula Rosato, Fernanda Velasque, Alex Pfaifer, Patrícia Coelho, Ester, Patrícia Pettes e Carol.

Ao amigo e professor Dalton Guaglianoni pela elaboração da estatística deste trabalho e, sua esposa Neusa, pela colaboração.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal que colaboraram direta e indiretamente.

Aos integrantes do Laboratório de Bioequivalência da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Sandra, Raquel, Kelly, França, Berê e Hell.

Ao Professor Aureo, ao Eugênio e ao Matheus, pela amizade e colaboração.

Aos companheiros de pós-graduação (equipe Valadão): Nilson, Juan, Renata dos Reis, Renata Gebara, Érica, Marina, Adriana, José Henrique, André, Paulo, Eric, Anderson e Andréia.

Ao Laboratório Cristália por conceder os fármacos utilizados neste estudo.

Aos amigos Welington Fávero, Rodrigo Biagioni, José Maria, Marcos Muniz, Jacques, Melissa Estevam, Maurício Munaretti e Débora, que sempre me ajudaram nos momentos ausentes em Araraquara.

A Bebel, Cocker companheira nas horas de solidão no apartamento, aos animais “vizinhos” Polly, Cookie, Baby, Ayna, Layla, Juninho, Pingo e Pandora e, a todos os animais que me ajudaram involuntariamente neste estudo: Jack Joy, Darlene, Laura, Maria Clara, Smurf, Derico, Chaplin e Atômico.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Noções gerais sobre farmacocinética.....	03
2.2. Interações farmacocinéticas.....	06
2.3. Anestésicos dissociativos.....	07
2.3.1. Cetamina S(+).	09
2.3.2. Efeitos no sistema nervoso central.....	11
2.3.3. Efeitos cardiovasculares.....	12
2.3.4. Efeitos respiratórios.....	12
2.4. Midazolam.....	13
2.5. Associação da cetamina aos benzodiazepínicos.....	13
2.6. Biotelemetria.....	14
2.7. Cromatografia Líquida.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Procedimento experimental.....	18
3.2.1. Análise cromatográfica.....	18
3.2.2. Análise farmacocinética.....	22
3.2.3. Biotelemetria.....	22
3.3. Delineamento experimental.....	23
3.4. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Estudo da disposição cinética da cetamina S(+).	26
4.2. Análise farmacocinética.....	30
4.3. Observações do período anestésico e pós-anestésico.....	35
4.4. Biotelemetria.....	35
4.4.1. Frequência cardíaca.....	35

4.4.2. Temperatura corpórea.....	37
4.4.3. Movimentos dentro da gaiola.....	39
4.4.4. Pressão arterial média.....	41
4.4.5. Pressão arterial diastólica.....	43
4.4.6. Pressão arterial sistólica.....	45
4.5. Parâmetros fisiológicos.....	47
4.5.1. Freqüência cardíaca.....	47
4.5.2. Temperatura retal.....	51
4.5.3. Freqüência respiratória.....	54
4.6. Avaliação geral dos parâmetros analisados.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE TABELAS

		Página
1.	Parâmetros farmacocinéticos analisados.....	22
2.	Determinação da curva padrão de cetamina S(+)[.....	26
3.	Determinação das concentrações obtidas após a injeção de amostras de plasma canino adicionadas de cetamina S(+)	27
4.	Determinação da seletividade do método em plasma canino adicionado de cetamina S(+) na mesmas concentrações da curva padrão	28
5.	Determinação da recuperação do método analítico empregado para mensurar a concentração da cetamina S(+) em plasma canino.....	29
6.	Determinação da precisão intra e inter-ensaio do método analítico empregado para mensurar a concentração de cetamina S(+) em plasma canino	30
7.	Determinação dos limites de detecção e de quantificação de amostras de plasma canino adicionadas de diferentes concentrações de cetamina S(+)	30
8.	Valores médios, desvios padrão e valor de p dos parâmetros farmacocinéticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	32
9.	Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (batimento/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam	36
10.	Valores médios e desvios padrão da temperatura (°C) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	38

11.	Valores médios e desvios padrão dos movimentos (movimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtidos pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	40
12.	Valores médios e desvios padrão da pressão arterial média (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	42
13.	Valores médios e desvios padrão da pressão arterial diastólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam...	44
14.	Valores médios e desvios padrão da pressão arterial sistólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+)isoladamente ou associada ao midazolam....	46
15.	Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtidos pela auscultação cardíaca em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	48
16.	Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) em função do tempo (minutos) obtida com auxílio de um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	51
17.	Valores médios e desvios padrão da frequência respiratória em função do tempo (minutos) obtidos pela auscultação pulmonar em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam...	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Configuração absoluta dos enantiômeros: cetamina R(-) e cetamina S(+)..	08
2. Ilustração fotográfica de um cromatógrafo: composto pela bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador.....	16
3. Curva de padrão obtida com injeção direta das soluções de cetamina S(+) utilizada como referência para a determinação da concentração de cetamina S(+) no plasma canino.....	27
4. Curva das médias da concentração plasmática da cetamina S(+) ($\mu\text{g/mL}$) em relação ao tempo (minutos).....	31
5. Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão e valor da meia vida de distribuição, da constante de eliminação, área sob a curva e constante de distribuição, obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	33
6. Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão e valor de p da meia vida de eliminação, clearance e volume de distribuição, obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	34
7. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos), obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	37
8. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.....	39

9. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para movimentos (movimentos/minuto), em função do tempo (minutos), obtido pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 41
10. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial média (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 43
11. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial diastólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 45
12. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial sistólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 47
13. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela auscultação cardíaca e pela aferição com um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 49
14. Representação gráfica dos valores médios para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela auscultação cardíaca e pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam 50
15. Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para temperatura (°C) em função do tempo (minutos) aferida com um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 52

16. Representação gráfica dos valores médios para temperatura (°C) em função do tempo (minutos) obtida pela aferição com termômetro clínico e pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 53
17. Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão para frequência respiratória (movimentos/minuto) em função do tempo (minutos), obtida pela auscultação pulmonar em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam 55
18. Representação gráfica dos valores médios para movimentos (movimentos/minuto), temperatura (°C), pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (batimentos/minuto), obtidos pela biotelemetria, e frequência respiratória, obtida pela auscultação pulmonar, em função do tempo (minutos), em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam..... 56

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA CETAMINA S(+) ASSOCIADA OU NÃO AO MIDAZOLAM, EM CÃES.

RESUMO

A cetamina, um anestésico dissociativo, é amplamente empregado para a indução e manutenção da anestesia em cães. Possui dois enantiômeros, sendo o S(+), de atividade anestésica superior. Com este estudo objetivou-se correlacionar os parâmetros clínicos com os aspectos farmacocinéticos da cetamina S(+), bem como avaliar, o método de HPLC para quantificação deste fármaco e, as alterações farmacodinâmicas e farmacocinéticas observadas na associação deste com o midazolam. Para tanto, a cetamina S(+) foi administrada em oito cães, sendo quatro fêmeas da raça Beagle e quatro machos sem raça definida, pela via intravenosa na dose de 10mg/kg, associada ou não ao midazolam (0,2mg/kg), em duas fases distintas. A análise farmacocinética foi realizada através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de quatro fêmeas e um macho. Os parâmetros clínicos foram obtidos por meio da biotelemetria nas quatro fêmeas e, semiotecnicamente, nos quatro machos, por um período de 12 horas. Observou-se que a concentração máxima, cinco minutos após a aplicação, foi de 35,1 e 18,7 µg/mL, a meia vida de distribuição de 0,142 e 0,234 horas, a meia vida de eliminação de 3,70 e 4,06 horas, o clearance de 2,40 e 4,36 L/kg.h e o volume de distribuição de 9,70 e 16,47 L/kg, para a cetamina S(+) isolada e associada ao midazolam, respectivamente. Não foram detectadas diferenças estatísticas para os parâmetros farmacocinéticos analisados, porém foram detectadas em

alguns momentos para os parâmetros clínicos. Pode-se concluir que a presença do midazolam não altera os parâmetros clínicos e farmacocinéticos da cetamina S(+) em cães e, que a biodisponibilidade foi coincidente com as alterações clínicas monitoradas por meio da biotelemetria.

Palavras-chave: cão; cetamina S(+); midazolam; biotelemetria; cromatografia líquida.

PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF KETAMINE S(+) ISOLATED OR ASSOCIATED TO MIDAZOLAM IN DOGS

ABSTRACT

Ketamine, a dissociative anesthetic agent, is widely used for induction and maintenance of anesthesia in dogs. It has two enantiomers, from which the S(+) has a greater anesthetic activity. The aim of this study was to correlate clinical parameters with pharmacokinetics aspects of ketamine S(+) as well as evaluating, the HPLC method for quantification this drug and, observed the pharmacodynamics and pharmacokinetics alterations in the association of this drug with midazolam it. For this, the ketamine was administered intravenously in eight dogs (four females beagles and four crossbreed males) at a dose of 10mg/kg, associated or not to midazolam (0.2mg/kg), in two distinct phases. Pharmacokinetic analysis was accomplished through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in serum samples of four females and a male. Clinical parameters were obtained through biotelemetry in the four females and semiotechnically in the four males, for 12 hour period. It was noticed that five minutes after the administration the maximum concentration was 35.1 and 18.7 µg/mL, Half-life of distribution was 0.142 and 0.234 hours, and half life of elimination was 3.7 and 4.06 hours, clearance was 2.40 and 4.36 L/kg.h and the volume of distribution was 9.70 and 16.47 L/kg, for ketamine S(+) isolated and associated to midazolam, respectively. No statistical difference was noticed in

the pharmacokinetic parameters, however there were differences in clinical parameters in some periods. In conclusion, the presence of midazolam does not alter clinical and pharmacokinetics parameters of ketamine S(+) in dogs and the biodisponibility of the drug was in accordance with clinical alterations monitored through biotelemetry.

Key words: dog; ketamina S(+); midazolam; biotelemetry; Liquid chromatography.

1. INTRODUÇÃO

A cetamina, anestésico dissociativo, tem sido utilizada na Medicina Veterinária para indução e manutenção da anestesia há mais de 30 anos. Produz rapidamente um estado anestésico, diferente daqueles observados com outros anestésicos, que resulta em analgesia profunda, falta de resposta condicionada e amnésia (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; BERGMAN, 1999). É encontrada no mercado na forma de mistura racêmica dos enantiômeros, (-)-(R)-cetamina e (+)-(S)-cetamina ou na forma enantioméricamente pura S(+). Diversos autores apontam que S(+) cetamina possui atividade anestésica superior quando comparada à R(-) cetamina (LANDONI, 1997; KIEMBAUM, 2001).

Os efeitos secundários da cetamina incluem alterações nos sistemas nervoso central, cardiovascular e sistema muscular, como excitação, hipertensão e hipertonicidade muscular. Para minimizar tais efeitos recomenda-se associá-la a um agente sedativo ou tranqüilizante, sendo o midazolam o benzodiazepínico de eleição para associação devido às propriedades hipnóticas e miorelaxantes, que reduz o aparecimento de fenômenos emergenciais produzidos pelo uso isolado da cetamina, prevalecendo o relaxamento muscular e da depressão central (VALADÃO, 2002; BROWN et al., 1992).

A associação medicamentosa tem a finalidade de aumentar a eficácia terapêutica, no entanto podem ocorrer interações, seja na fase farmacocinética ou farmacodinâmica que levam ao aparecimento de efeitos indesejados. Atualmente os estudos em farmacocinética, têm envolvido a utilização de técnicas cromatográficas tais como HPLC (cromatografia líquida de alta performance), que possui sensibilidade e especificidade adequadas a essa finalidade (BOLZE & BOULIEU, 1998).

Por outro lado, a biotelemetria é um método que permite o monitoramento de vários animais ao mesmo tempo, mensurando diferentes parâmetros fisiológicos por

longos períodos sem interferência com o padrão de comportamento (BROOKS et al., 1996; TRUETT & WEST, 1995; SADOFF et al., 1992; STOHR, 1998).

Embora a cetamina S(+) já venha sendo empregada na anestesia de cães e gatos (SOUZA et al, 2002) e em técnicas de analgesia epidural (OLESKOVICZ et al., 2006), não existem trabalhos onde tenha sido quantificado e estudado o perfil da cetamina S(+) isoladamente ou em associação com outros fármacos em plasma canino.

Desta forma objetivou-se verificar a eficiência do método de HPLC para quantificar a cetamina S(+) e estudar os perfis farmacológico e comportamental da cetamina S(+) administrada isoladamente ou em associação ao midazolam, utilizando-se das técnicas de cromatografia líquida e biotelemetria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Noções gerais sobre farmacocinética

A farmacocinética compreende quatro processos fundamentais: absorção, quando a administração do fármaco é por via extra-vascular, distribuição, biotransformação e excreção.

A absorção, primeira fase farmacocinética, pode ser definida como a passagem do fármaco de um meio externo ao organismo para o sangue, que o conduzirá aos diferentes tecidos e órgãos. Para que esse processo ocorra é necessário que o fármaco atravesse as membranas biológicas sob influência das características físico-químicas de ambos (WINTER, 1988).

O processo de absorção pode ser avaliado por quatro parâmetros farmacocinéticos obtidos através da construção de uma curva de sua concentração plasmática *versus* tempo: k_a (constante de absorção), C_{max} (concentração plasmática máxima), t_{max} (tempo de ocorrência da concentração plasmática máxima) e AUC (área sob a curva) (BOROUJERDI, 2002).

Após a administração intravenosa, o fármaco distribui-se para outros compartimentos (WINTER, 1988). A velocidade de distribuição sofre interferência de alguns fatores fisiológicos como fluxo sanguíneo e características da membrana, assim como das propriedades físico-químicas do fármaco que determinam a sua capacidade para atravessar as membranas e sua afinidade para ligar-se com proteínas plasmáticas. Quanto maior a afinidade e extensão de ligação com essas proteínas, menor o acesso desse fármaco a outros compartimentos do organismo.

O processo de distribuição de um fármaco pode ser quantificado, através do parâmetro volume de distribuição (Vd) que descreve a relação entre a quantidade do fármaco existente em todo o organismo e a quantidade existente no plasma, e conceitualmente se define como o volume no qual o fármaco deve estar contido para que a sua concentração se iguale a do plasma (WINTER, 1988).

Em farmacocinética clínica, o V_d é um importante parâmetro empregado para a construção do regime de dose que será utilizado no paciente. Em conjunto com a concentração alvo no estado de equilíbrio, o V_d pode ser utilizado para calcular a dose de ataque; para calcular a quantidade do fármaco no organismo em qualquer momento e para estimar a viabilidade de se utilizar a hemoperfusão ou hemodiálise para a remoção do fármaco do organismo (BOROUJERDI, 2002).

Na biotransformação o fármaco é submetido a reações químicas, geralmente mediadas por enzimas, que o convertem em um ou mais compostos diferentes do originalmente administrado (metabólitos). As reações mais comuns da biotransformação de fármacos são: oxidação, redução, hidrólise e conjugação. Os metabólitos podem, por sua vez, também serem biotransformados. As reações de oxidação, redução e hidrólise são classificadas como de fase I, as de conjugação como de fase II do processo de biotransformação (WINTER, 1988).

Para maioria dos fármacos utilizados na terapêutica, a biotransformação é um processo essencial para a sua inativação e excreção renal. Apenas uma pequena parte das substâncias é eliminada do organismo de forma inalterada, alguns fármacos são excretados pela bile e substâncias voláteis são excretadas pelos pulmões (WINTER, 1988).

Em geral, o fígado é o maior e algumas vezes o único sítio de biotransformação de fármacos, mas ocasionalmente o fármaco é biotransformado em outros tecidos como os rins, pele, pulmões, sangue e trato gastrointestinal.

O complexo enzimático CYP450 é o principal responsável pela biotransformação de fármacos no organismo humano, mais propriamente pelas reações de oxidação da fase I. Esse sistema, presente em maior quantidade e variabilidade no tecido hepático pode também ser encontrado nos pulmões, rins, bexiga e outros órgãos em menor quantidade. O CYP450 apresenta várias isoformas, que são formas múltiplas de uma mesma enzima, que catalisam o mesmo tipo de reação com afinidades diferentes frente aos substratos,

biotransformando portanto, fármacos distintos. Além disso, as isoformas diferem na sua distribuição pelo organismo e na modulação de sua atividade, apresentando diferentes inibidores, indutores e fármacos marcadores (WINTER, 1988).

No processo de biotransformação podem ser originados produtos farmacologicamente ativos, produtos inativos ou produtos dotados de significativa toxicidade. De maneira geral, esses produtos possuem maior hidrossolubilidade e, portanto, são mais facilmente eliminados pelo organismo.

Quando administrados pela via oral, os fármacos atingem o sistema porta hepático para chegar à circulação sistêmica, expondo a dose administrada aos sistemas enzimáticos. Se o fármaco for passível de rápida e considerável biotransformação nessa primeira passagem pelo tecido hepático, somente pequena fração da dose administrada alcançará a circulação sistêmica (efeito de primeira passagem), levando à baixa biodisponibilidade (WINTER, 1988).

Os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de biotransformação são: a constante de eliminação (K_{el}) e o "clearance" (Cl) (WINTER, 1988).

A meia vida ($t_{1/2}$) de eliminação é um parâmetro híbrido do clearance e do volume de distribuição, que representa o tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco decline para a metade (WINTER, 1988).

A excreção é a passagem do fármaco da circulação sangüínea para o meio externo, sendo os rins, as principais vias de excreção dessas substâncias. Os mecanismos envolvidos na excreção renal é a filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a difusão passiva; sendo os dois primeiros os mais efetivos (WINTER, 1988).

Na insuficiência renal, fármacos e produtos de biotransformação ativos, excretados fundamentalmente pelos rins, podem acumular-se e alterar assim, os parâmetros farmacocinéticos relacionados ao processo de eliminação: constante de eliminação (K_{el}) e "clearance" (Cl), com conseqüências sobre a meia vida do fármaco.

“Clearance” é um termo usado para indicar a remoção ou depuração completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. O “clearance” é expresso em volume por unidade de tempo (mL/min ou L/h), e compreende todos os processos que resultem na eliminação do fármaco do organismo (WINTER, 1988).

2.2. Interações farmacocinéticas

A utilização de mais de um fármaco concomitantemente na terapêutica, pode resultar em interações de tal forma que os efeitos farmacológicos esperados ocorram de maneira diferenciada, podendo-se obter um aumento ou uma diminuição da eficácia terapêutica. Da mesma maneira, a interação pode acentuar ou atenuar os efeitos indesejáveis (HARDMAN & LIMBIRD, 2004; OGA et al., 2002; FUHR, 2000). Essas interações podem ocorrer na fase pré-cinética (antes da absorção propriamente dita), na fase cinética e ou na fase farmacodinâmica (OGA et al., 2002).

Na fase pré-cinética reações entre os princípios ativos podem resultar na diminuição da absorção ou aumento da toxicidade, como por exemplo, a colestiramina e o colestipol, que complexam uma série de medicamentos como antidepressivos, neurolépticos, digitálicos e anticoagulantes, diminuindo a sua disponibilidade para a absorção (OGA et al., 2002).

Na fase farmacocinética os agentes são capazes de modificar a absorção, a distribuição, a biotransformação ou a excreção de outro agente administrado concomitantemente. (OGA et al., 2002)

A absorção é um dos fenômenos cinéticos mais importantes na determinação na concentração sérica de fármacos por via oral, tópica ou parenteral, com exceção da via intravascular. A redução no grau de absorção resulta na diminuição do nível plasmático e tende a prejudicar a eficácia terapêutica. (OGA et al., 2002)

A alteração na fase de distribuição, quando há associação de dois componentes medicamentosos, se dá principalmente por mecanismo competitivo frente a sítios comuns de ligação protéicos, sendo a albumina a

proteína ligante mais importante e responsável pela fixação de compostos ácidos e a alfa glicoproteína ácida (AGA) pela fixação de fármacos de caráter básico. O efeito da interação entre dois fármacos por competição junto às proteínas resulta no aumento da fração livre de um dos fármacos ou de ambos, com intensificação de suas ações farmacológicas terapêuticas ou mesmo tóxicas. (OGA et al., 2002)

A importância clínica dessas interações é evidente, especialmente quando os fármacos que interagem possuem alta fixação, ou seja, ligam-se às proteínas plasmáticas com uma porcentagem acima de 75-80% (HARDMAN & LIMBIRD, 2004).

As interações de fármacos na fase de biotransformação podem resultar em indução ou inibição de sistemas enzimáticos, principalmente sobre o citocromo P450 (CYP450); além da possibilidade de saturação do processo de biotransformação por competição entre esses fármacos pelos sistemas enzimáticos (HARDMAN & LIMBIRD, 2004). Assim, a alteração metabólica causada por um fármaco pode afetar a velocidade de biotransformação de outros fármacos e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade e a eficácia terapêutica. A inibição da biotransformação de um fármaco resulta quase sempre na exacerbação dos efeitos farmacológicos e/ou tóxicos.

Entre os mecanismos envolvidos nas interações de fármacos durante a excreção, particularmente por via renal, é importante ressaltar o seguinte: a)- alteração do pH do líquido intra-tubular que promove modificação no grau de dissociação de eletrólitos fracos, ocasionando sua maior ou menor excreção renal e b)- duas substâncias que podem competir entre si, na secreção tubular, por apresentarem afinidade às mesmas proteínas transportadoras; nessas situações, ambas terão excreção retardada.

Condições mórbidas pré-existentes, especialmente as insuficiências cardíaca, renal ou hepática, são decisivas para intensificação dos efeitos adversos dos medicamentos e podem levar, geralmente, ao acúmulo de fármacos no organismo (OGA et al., 2002).

2.3. Anestésicos dissociativos

A cetamina [2-(Oclorofenil)-2-metilamino ciclohexanona] (Figura 1), um anestésico geral dissociativo, surgiu na década de 60, em substituição a fenciclidina, com o objetivo de produzir menor intensidade de reações adversas. Este fármaco produz um estado anestésico caracterizado por dissociar o sistema tálamocortical do sistema límbico, por isto, é denominado de anestésico dissociativo (VALADÃO, 2002; BERGMAN, 1999).

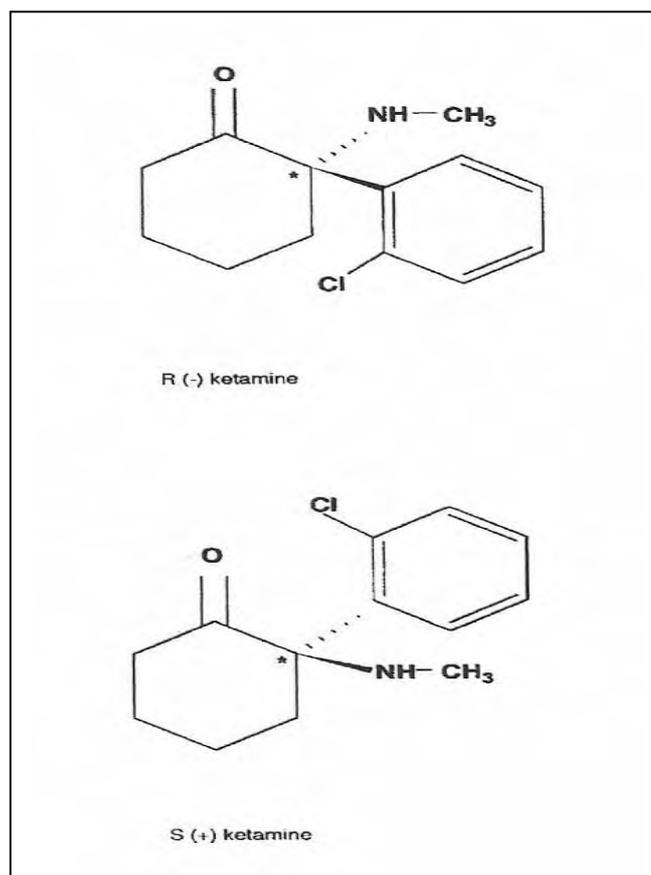


Figura 1: Configuração absoluta dos enantiômeros: no topo, cetamina R (-) e abaixo, cetamina S(+). Os asteriscos denotam átomos de carbono (LANDONI et al. 1997).

Este anestésico atua diretamente nas áreas corticais de associação sensorial que fazem parte do sistema límbico e também suprime a transmissão de impulsos nociceptivos na formação reticular mesencefálica e no núcleo

medial do tálamo (SCHWENDER et al., 1994). Devido a isso, os centros superiores do sistema nervoso central (SNC) são incapazes de receber ou processar informação sensorial e, conseqüentemente, seu significado emocional não é avaliado. O resultado da administração de cetamina é anestesia, analgesia, amnésia e supressão do medo e da ansiedade (BERGMAN, 1999).

O mecanismo de ação da cetamina tem sido relacionado, principalmente, com a inibição não competitiva dos receptores glutaminérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), mas também foi proposta a interação com receptores glutaminérgicos não NMDA, receptores opióides, receptores para o ácido gama-amino-butírico (GABA) do tipo A, receptores nicotínicos e muscarínicos e com os canais de sódio, potássio e cálcio. No entanto, a ação em receptores diferentes do NMDA é observada exclusivamente com concentrações plasmáticas particularmente elevadas, 10-100 vezes maiores às observadas durante a anestesia (250-1000µg/L) (WHITE et al., 1982; BRÄU et al., 1997; BERGMAN, 1999).

É um composto hidrossolúvel, com pKa 7,5, que permite a administração intravenosa, intramuscular, intranasal, oral e retal. Atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica e, por essa razão, quando administrada pela via intravenosa, seus efeitos são observados dentro de 60 segundos após a aplicação (BERGMAN, 1999). Em cães, sua meia-vida é de 61 minutos e sua taxa de ligação às proteínas plasmáticas é de 53,5% (KAKA & HAYTON, 1980).

A cetamina é amplamente biotransformada no fígado principalmente por N-demetilação, por meio do complexo citocromo P-450, tendo como produto a norcetamina, metabólito ativo com potência menor a cetamina. A norcetamina é hidroxilada em uma ou mais posições no anel ciclohexanona, formando hidroxinorcetamina, composto hidrossolúvel mais facilmente conjugado e eliminado (WHITE et al. 1982).

2.3.1. Cetamina S(+)

A cetamina é um composto quiral e apresenta-se na forma de dois enantiômeros: S(+) e R(-) cetamina. A quiralidade é uma condição necessária para que a molécula apresente atividade óptica.

A cetamina durante algum tempo só era encontrada no mercado unicamente na forma de racemato, contendo concentrações iguais dos dois isômeros ópticos R(-) e S(+), mas recentemente no Brasil, começou a ser comercializada uma formulação contendo somente o isômero S(+).

O clearance plasmático da cetamina S(+), administrada isoladamente, é maior do que o do isômero R(-) e do que o do isômero S(+) administrados no racemato, tanto na espécie canina, quanto na espécie humana (IHMSEN et al., 2001). Este fato pode explicar a recuperação anestésica mais rápida em pacientes anestesiados com cetamina S(+) quando comparada à anestesia com cetamina racêmica. Também foi demonstrado que as duas substâncias competem pelo mesmo complexo de enzimas hepáticas (KHARASCH & LABROO, 1992), o que reduziria a biotransformação quando administradas na forma de racemato (IHMSEN et al., 2001).

Estudos demonstram que doses equipotentes de cetamina e de cetamina S(+) têm efeitos cardiorrespiratórios muito similares (ADAMS et al., 1992; DOENICKE et al., 1992; ZIELMANN, et al., 1997; STRÜMPER et al., 2004). O uso de doses totais muito menores para produzir anestesia e analgesia satisfatórias, a recuperação anestésica mais rápida, a menor incidência de efeitos indesejáveis na recuperação da anestesia (WHITE et al., 1980; NAU & STRICHARTZ, 2002) e os efeitos estereoseletivos de neuroproteção, preservação do pré-condicionamento isquêmico e menor potencial hipotensivo (KANELLOPOULOS, et al., 1998; MÜLLENHEIM et al., 2001; PROESCHOLDT et al., 2001) fazem da cetamina S(+) um exemplo de como o uso de um enantiômero apresenta vantagens potenciais sobre o emprego do racemato.

Trabalhos experimentais e ensaios clínicos consideraram que a cetamina S(+) possui o dobro da potência anestésica e analgésica, quando comparada à cetamina racêmica no homem e em outras espécies. Essa tendência pode ser

confirmada em estudos com camundongos (SARTON et al., 2001), ratos (PROESCHOLDT et al., 2001), ovelhas (STRÜMPER et al., 2004) e cavalos (DUQUE et al., 2005).

MUIR & HUBELL (1988) compararam doses iguais (30mg/kg,IV) e não equipotentes de cetamina racêmica e de cetamina S(+) em cães, não observando diferenças entre os efeitos cardiopulmonares das duas substâncias. SOUZA et al., (2002) concluíram que doses iguais e não equipotentes (20mg/kg,IM) tem efeitos similares na condutividade elétrica cardíaca na espécie canina, DELEFORGE et al. (1991) observaram efeitos equianestésicos, em duração e qualidade, após administrar cetamina racêmica (10mg/kg) ou cetamina S(+) (6,6mg/kg) em cães da raça Beagle.

MARIETTA et al. (1977), RYDER et al.(1978) e WHITE et al. (1980) sugerem uma redução de 50% da dose quando se usa o isômero S(+) da cetamina isoladamente. Porém, trabalhos mais recentes indicam uma redução da dose da cetamina S(+) de 15 a 30% em relação a cetamina racêmica usada em cães (DUQUE et al., 2005).

2.3.2. Efeitos no sistema nervoso central

A cetamina provoca mudanças consistentes no eletroencefalograma, diminuindo a atividade alfa e aumentando a atividade gama e delta, além de induzir atividade excitatória que ocorre no tálamo e sistema límbico. Aumenta a pressão do fluido cerebrospinal e pressão intracraniana que pode ser decorrente do aumento da concentração arterial de dióxido de carbono, provocado pela depressão respiratória, aumentando o fluxo sanguíneo cerebral e consumo de oxigênio. Pode promover melhor analgesia para dor somática que para dor visceral, bloqueando área reticular espinal, deprimindo o núcleo da formação reticular medular medial, suprimindo a lâmina da medula espinal, interagindo com receptores opióides do SNC e medula espinal e antagonizando os receptores do tipo NMDA (VALADÃO, 2002)

Os agonistas dos receptores NMDA aumentam o fluxo intracelular de cálcio, induzindo convulsões diretamente ou diminuindo o limiar convulsivo

diante de estímulos como a hipóxia. Por isso, acredita-se que a cetamina, um antagonista não competitivo dos receptores NMDA, tem efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores (PFENNINGER & HIMMELSEHER, 1997; REDER et al., 1980).

A cetamina não induz atividade convulsiva em seres humanos com histórico de epilepsia, porém este fármaco pode induzir convulsões em cães e gatos epiléticos sendo assim, estabeleceu-se que o uso deste anestésico é contra-indicado em animais com histórico prévio de convulsões. Porém a variabilidade entre as espécies torna difícil a interpretação dos dados fazendo com que ainda exista controvérsia se a cetamina é anticonvulsiva ou pró-convulsiva (LIN, 1996).

2.3.3. Efeitos cardiovasculares

Em cães e no homem a cetamina ocasiona aumento na frequência cardíaca, pressão arterial, pressão da artéria pulmonar, no débito cardíaco, transporte e consumo de O₂ (BERGMAN, 1999; HASKINS et al., 1985). Já foram relatados efeitos inotrópicos positivos e efeitos depressores do miocárdio, devido à interferência com a disponibilidade intracelular de cálcio (KONSAYREEPONG et al., 1993). Porém, quando o sistema simpático está intacto, predominam os efeitos estimulantes decorrentes da inibição da recaptação das catecolaminas (COOK et al., 1991).

A cetamina pode sensibilizar o miocárdio à ação das catecolaminas, porém evita as arritmias induzidas pela administração de epinefrina, por meio de prolongação do período refratário, além de ser capaz de reverter, em cães, arritmias causadas por digitálicos (DOWDY & KAYA, 1968; NUNES, 1995).

Quanto às alterações vasculares, a cetamina pode ocasionar tanto vasoconstrição quanto vasodilatação, tendo como resultado pouca ou nenhuma alteração na resistência vascular sistêmica (WHITE et al., 1982).

2.3.4. Efeitos respiratórios

Em cães anestesiados com cetamina observa-se a diminuição da frequência respiratória e do volume minuto durante aproximadamente 15 minutos (HASKINS et al., 1985). Já o uso de doses elevadas podem causar respiração profunda com pausa inspiratória prolongada e, em alguns casos extremos, apnéia e parada respiratória (LIN, 1996). Geralmente, a ventilação é mantida adequadamente durante a anestesia com cetamina, mas o uso de doses elevadas ou a interação com agentes depressores do sistema nervoso central resultam em hipercapnia e hipóxia (OKLU et al., 2003).

Clinicamente, a cetamina não altera as respostas à hipercapnia (SOLIMAN et al., 1975) nem à hipóxia (LERMAN et al., 1986) e, além disso, devido à manutenção do tônus muscular, a ventilação e o volume residual funcional são preservados (LIN, 1996). Porém, quando este fármaco é injetado na forma de bolus rápido, em pacientes não pré-medicados e respirando espontaneamente ar ambiente, pode ocorrer diminuição da pressão parcial de oxigênio arterial. Por outro lado, a pré-medicação com diazepam e a administração lenta (60 segundos) não provocam mudanças na pressão parcial de oxigênio arterial nem na diferença arterio-venosa de O₂ (RUST et al., 1978).

2.4. Midazolam

O midazolam, derivado de um imidazobenzodiazepínico, foi o primeiro benzodiazepínico hidrossolúvel disponível para o uso clínico em humanos. Promove efeitos ansiolíticos, tranqüilizantes, hipnóticos, miorelaxantes e provoca amnésia e alterações psicomotoras. Pode ocasionar queda de pressão arterial, decorrente da redução da resistência vascular periférica e, quando utilizado *in bolus* pela via intravenosa, pode causar apnéia transitória. Tem alta lipossolubilidade, é rapidamente absorvido independentemente da via de administração e atravessa a barreira hematoencefálica com relativa facilidade. Ligam-se extensivamente as proteínas plasmáticas (97%) e sua biotransformação ocorre por ação oxidativa, principalmente por ação dos microsomas hepáticos, isoenzimas pertencentes ao sistema de citocromo P-

450. Sua eliminação se faz fundamentalmente pela urina. Possui meia-vida de 1,3 a 2,2 horas e seu período de latência é de 90 segundos quando administrado pela via intravenosa. Diferente dos outros benzodiazepínicos, o midazolam tem maior potência hipnótica e é compatível com dextrose a 5%, cloreto de sódio 0,9% e solução de Ringer com lactato, em recipientes de vidro ou plástico. O midazolam também é compatível físico-quimicamente com a morfina, meperidina, escopolamina, atropina, glicopirrolato, fentanil e cetamina em soluções aquosa, podendo assim ser combinado em formulações com estes fármacos (FANTONI & CORTOPASSI, 2002).

2.5. Associação da cetamina com benzodiazepínicos

Os tranqüilizantes benzodiazepínicos causam relaxamento muscular e potencializa os efeitos anestésicos da cetamina. Porém, a maioria dos benzodiazepínicos não são solúveis em água e podem precipitar quando adicionados à solução de cetamina. A associação de cetamina e midazolam pode ser mantida em soluções, sem perda de potência, por 24 horas e, junto com o cloreto de sódio, por até 100hs. Quando o pH é maior que quatro, como no plasma, o midazolam se torna rapidamente lipossolúvel. Como a cetamina, o midazolam é rapidamente absorvido após aplicação intramuscular e o início dos efeitos no sistema nervoso central ocorre em 1 a 2 minutos após aplicação intravascular. Então, o midazolam é o benzodiazepínico de eleição para a associação com a cetamina, baseado nas propriedades farmacêuticas do mesmo. (BROWN et al., 1992)

2.6. Biotelemetria

A mensuração dos parâmetros clínicos mostra-se relevante nas avaliações fármaco e toxicológicas, tornando-se um instrumento importante para predizer se um novo composto será seguro e efetivo. Algumas técnicas têm sido empregadas para determinar as alterações clínicas. Porém, quase sempre, a manipulação para a colheita dos dados causa, por menor que seja, interferência

nos dados dependentes de ativação humoral, como a frequência cardíaca e a pressão arterial.

Os procedimentos mais usados para o monitoramento de animais conscientes usam a contenção física ou equipamentos que avaliam os parâmetros clínicos por meio de implantes cirúrgicos de eletrodos, cateteres vasculares ou manguito de aferição de pressão sangüínea. Estes procedimentos causam estresse de manipulação no momento das avaliações, podendo prejudicar a validação das respostas (TRUETT & WEST, 1995; BROOKS et al., 1996).

A biotelemetria é um sistema que possibilita monitorizar vários animais ao mesmo tempo, mensurando diferentes parâmetros fisiológicos por longos períodos sem interferência com o padrão de comportamento (STOHR, 1988; SADDOF et al., 1992; TRUETT & WEST, 1995; BROOKS et al., 1996).

Os altos níveis de confiabilidade e fidelidade dos dados conseguidos por esta técnica, em relação aos obtidos por mensuração direta, credita o seu uso em inúmeros estudos sobre os mecanismos de ação dos barorreceptores em condições fisiológicas normais e também, durante o sono sobre a cronobiologia da regulação da pressão arterial e da frequência cardíaca, em situações de hipertensão arterial, sob efeito de diferentes substâncias, além de permitir que se utilize uma amostra populacional bem menor, em relação às técnicas convencionais aplicadas num determinado experimento (ARMENTANO et al., 1990; SADDOF et al., 1992; BODEY et al., 1996; BROOKS et al., 1996; ANDERSON et al., 1999; LEFCOURT et al., 1999; MISHINA et al., 1999).

2.7. Cromatografia Líquida

Cromatografia, basicamente, é um processo de separação de componentes de misturas moleculares através de duas fases imiscíveis, uma delas deslocando-se (fase móvel) em relação à outra que permanece estacionária. A separação cromatográfica se efetua através da migração diferencial dos componentes da mistura no sistema bifásico, essencialmente por adsorção. Substâncias diferentes migram com velocidades diferentes de acordo

com sua afinidade para cada uma das fases, daí a possibilidade de serem separadas. A distinção entre os principais métodos cromatográficos é feita em termos das propriedades da fase móvel (GILL, 1986).

A cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) é um método cromatográfico cuja fase móvel é constituída por um líquido ou uma mistura de líquidos que se desloca sobre a fase estacionária sob alta pressão (GILL, 1986).

A fase móvel da cromatografia líquida deve ser um solvente que respeite algumas características impostas por esse método analítico. A principal característica é que a fase móvel dissolva a amostra sem qualquer interação química entre ambas.



Figura 2: Ilustração fotográfica de um cromatógrafo: composto pela bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador.

Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem

interferir na detecção do analito (substância de interesse) por ultravioleta (UV). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes, três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (GILL, 1986).

Como fase estacionária utiliza-se sólidos ou semi-rígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar. A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões a serem usadas. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina) (GILL, 1986).

Os detectores mais usados na cromatografia líquida são os baseados na absorvância no espectro ultra-violeta e no visível (UV/VIS) (GILL, 1986).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados oito cães, machos ou fêmeas, castrados e esplenectomizados, considerados hígidos ao exame clínico-laboratorial, pesando entre 8 e 10kg, da raça Beagle e sem raça definida, com idade variando entre 5 e 7 anos. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas instalações do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária junto ao Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, em ambiente climatizado (20-24^oC) e alimentados com ração industrializada e água *ad libitum*.

Foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma, creatinina sérica, uréia, cálcio, fósforo, alanina amino transferase-ALT, aspartato amino transferase-AST, fosfatase alcalina, gama glutaril transferase-GGT, albumina, proteínas totais e glicose) para considerar os animais como hígidos.

3.2. Procedimento experimental

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e do Bem Estar dos Animais (CEBEA) do Campus de Jaboticabal da Unesp, conforme protocolo nº 007183-05.

3.2.1. Análise cromatográfica

Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (HPLC) Waters 600 Controller equipado com detector UV Waters 2487 operando a 215 nm, coluna Symmetry® C₁₈ (5 µm, 4,6 x 150 mm), com injetor manual e operando em modo gradiente, com utilização de pré-coluna Symmetry® C₁₈ e fase móvel constituída por mistura de tampão fosfato 0,03 mol/L (40%) , acetonitrila (45%), metanol (10%) e água (5%) no fluxo de 1,5 ml/min.

O padrão de cetamina racêmica e S(+) foi cedida pelo laboratório Cristália¹. A solução estoque de cetamina foi preparada em água na concentração de 100 µg/mL. A partir desta solução, foram preparadas as soluções diluídas 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 µg de cetamina por mL de água.

Os solventes empregados para a fase móvel do sistema cromatográfico foram: acetonitrila² (ACN) e metanol³, grau HPLC; fosfato de potássio monobásico anidro², utilizado no tampão 0,03mol/L.

Os solventes empregados nos diferentes procedimentos de extração realizados foram os seguintes: acetato de etila² e diclorometano²; éter etílico³ e n-hexano².

Foram preparadas soluções de HCL 50%², NaOH² 0,1N e ácido tricloroacético² 10%(TCA) em água, utilizadas no procedimento de extração. Também utilizamos solução de KOH² 1,0 M em água para ajuste do pH do tampão para 7,0.

Para os testes de seletividade do método analítico foram utilizados os padrões dos fármacos: diazepam⁴, amitriptilina⁵, clorpromazina⁶, imipramina⁷, fenobarbital⁸, morfina⁹, midazolam¹⁰.

Para análise das amostras de sangue que foram coletadas dos cães utilizados neste experimento, foi necessário o desenvolvimento de um método de extração da cetamina S(+) presente no plasma destes animais. Sendo assim, optou-se pelo procedimento de extração líquido-líquido, no qual realiza-se a contaminação do plasma com o fármaco desejado e trabalha-se com alterações das proporções entre sua forma molecular e ionizada através de alterações de

¹ Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

² J.T. Backer. Inc. Phillipsburg, NJ. EUA

³ Mallinckrodt Backer, Phillipsburg, NJ. EUA

⁴ Valium, 10mg/2mL, Roche, Jacarepaguá, RJ.

⁵ Eurofarma, Indústria Farmacêutica, Jurubatuba, São Paulo, SP.

⁶ União Química Farmacêutica S/A, São Paulo, SP.

⁷ Medley S/A Indústria Farmacêutica, Campinas, SP.

⁸ Gardenal 100mg/comp, Aventis Pharma Ltda, Suzano, São Paulo, SP.

⁹ Dimorf, 10mg/mL, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

¹⁰ Dormire, 5mg/5mL, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

pH, transferindo-o da fase aquosa (plasma) para a fase orgânica. Posteriormente, realiza-se a evaporação do solvente orgânico (promovendo concentração do analito) seguida da ressuspensão da amostra para injeção no HPLC.

O processo de validação incluiu os procedimentos necessários para a determinação dos limites de confiança do método, de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA (Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003). O objetivo desses procedimentos foi avaliar se o método analítico desenvolvido pode ser aplicado em estudos de farmacocinética da cetamina S(+)¹¹.

A partir da determinação das condições cromatográficas, iniciou-se a padronização do método com a construção da curva de calibração, através de injeções de diferentes concentrações de soluções de cetamina S(+) no sistema cromatográfico, necessária para a observação da linearidade de resposta e para o estudo de recuperação do método analítico. A curva foi construída com as concentrações: 0,25;0,5;1;2;4;6;8 e 10 µg/mL.

A linearidade foi estudada através da análise de amostras de plasma adicionadas de concentrações maiores de cetamina S(+) do que aquelas utilizadas na construção da curva de calibração. O método foi considerado linear até a maior concentração analisada, cujas replicatas apresentaram coeficiente de variação <15%. Foram analisadas, em triplicata, amostras com concentrações de 0,25 a 9 µg/mL de cetamina S(+)¹¹.

O limite de detecção foi determinado como a menor concentração detectada, cuja área da concentração mínima detectada corresponde a 3x o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração quantificada, cuja área da concentração mínima quantificada corresponde a 5x o valor da área do branco com coeficiente de variação menor que 20%, analisadas em 3 replicatas.

¹¹ Ketamin S(+),50mg/mL, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP.

A precisão foi avaliada através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de soro adicionados de três concentrações diferentes de cetamina S(+) (0,5 µg/mL, 2 µg/mL e 8 µg/mL), 5 replicatas durante 5 dias consecutivos (inter ensaios) e em 10 replicatas num mesmo ensaio (intra-ensaio), com coeficiente de variação menor que 15%. A exatidão (% erro sistemático) foi obtida através da avaliação da concordância dos resultados obtidos experimentalmente com os valores reais dos compostos na amostra, com coeficiente de variação menor que 15%.

O ensaio de estabilidade tem como finalidade verificar se a concentração da substância sofre alterações após um período específico de armazenamento pré-processamento laboratorial (CHANG, 2002).

As estabilidades dos analitos foram determinadas em curta e média duração. Alíquotas foram preparadas em três concentrações diferentes, baixa, média e alta e analisadas em cinco replicatas.

A estabilidade do analito foi determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. As alíquotas foram estocadas a uma temperatura de -20°C por 24h e descongeladas espontaneamente, a temperatura ambiente, passando por todo processo de derivatização como descrito anteriormente para posterior análise. Tal procedimento foi realizado por três dias consecutivos, sob as mesmas condições.

A estabilidade do analito foi analisada nos tempos zero, um, dois, quatro, oito e 21 dias de armazenamento, passando por todo processo de congelamento, descongelamento e derivatização, sob as mesmas condições.

A seletividade do método foi comprovada pela ausência de picos na região de interesse, quando os fármacos rifampicina¹², etambutol¹², pirazinamida¹², ácido acetil salicílico¹³, cafeína¹³, ranitidina¹³, loratadina¹⁴ e alopurinol¹² foram submetidos ao procedimento de análise empregado. Deve-se lembrar que estes fármacos foram escolhidos devido ao fato de serem

¹² Laboratório Neo-Química Comércio & Indústria Ltda, Anápolis - Goiás

¹³ Asta Médica Ltda, São Paulo, São Paulo

¹⁴ Aventis Pharma S.A., São Paulo

rotineiramente empregados contra os efeitos adversos do tratamento anti-tuberculose e apresentarem grande importância nos estudos clínicos.

3.2.2. Análise Farmacocinética

A disposição cinética da cetamina S(+) foi avaliada após a administração de dose única de 10 mg/Kg de cetamina S(+). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas curvas concentração plasmática x tempo.

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

As constantes de velocidade foram calculadas através da equação $0.693/t_{1/2}$. As áreas sob as curvas de *concentração plasmática x tempo* (AUC^{0-24}) foram calculadas através do método dos trapezóides. A AUC foi utilizada nos cálculos do *clearance* total aparente ($Cl/f = \text{dose}/AUC$) e do volume aparente de distribuição ($Vd/f = Cl/f/\beta$).

Tabela 1: Parâmetros farmacocinéticos que serão analisados neste estudo.

Parâmetro	Método para obtenção
AUC^{0-24}	Trapezóides
Ka	$0,693/t_{1/2}^a$
$T_{1/2} \alpha$	Resíduos
$K \alpha$	$0,693/t_{1/2}^a$
$T_{1/2} \alpha$	Resíduos
Vd/f (L)	$Cl/f/\beta$
Cl_T / f (L/h)	Dose/AUC
$T_{1/2}$ (h)	Gráfico
β (h^{-1})	$0,693/t_{1/2}$

3.2.3. Biotelemetria

A técnica de biotelemetria foi empregada somente nos animais do grupo A, que possuíam radiotransmissores implantados cirurgicamente no espaço subcutâneo da região paracostal esquerda.

Unidade de transmissão implantável (UTI), constituída por duas baterias sendo uma para a operação do sistema de colheita de dados e outra para o transmissor de rádio-frequência; um sensor de pressão arterial localizado no corpo do transmissor que possui um cateter (25x7F) preenchido com um líquido de baixa viscosidade o qual é revestido por uma membrana termoplástica, cuja extremidade possui um filme anti-trombogênico e um gel biocompatível. Também ligado ao corpo do transmissor encontram-se dois eletrodos de aço inoxidável flexível, isolados por tubos de silicone empregados para o registro da atividade cardíaca.

Os sinais do transmissor foram detectados e amplificados por antenas fixadas no teto de gaiolas, ligadas por cabos à matriz de consolidação, que por sua vez estava conectada ao computador, que posteriormente convertia estes sinais, em pulsos digitais, decodificando-os e armazenando-os.

3.3. Delineamento experimental

Para realização deste estudo foram instituídos dois grupos:

- Grupo A – quatro fêmeas da raça Beagle, denominadas de 1 a 4, com radiotransmissores implantados no espaço subcutâneo do flanco esquerdo, para transmitir os sinais para o equipamento de biotelemetria.
- Grupo B – quatro machos sem raça definida, denominados de 5 a 8, sem radiotransmissores.

Os dois grupos de animais foram submetidos a dois protocolos anestésicos, com intervalo de sete dias entre eles, para realização de *wash-out*. (eliminação do fármaco administrado).

- Protocolo I – utilizou-se da cetamina S(+) isolada, *in bolus*, pela via intravenosa, na dose de 10 mg/Kg.

- Protocolo II – utilizou-se da cetamina S(+) associada ao midazolam, *in bolus*, nas doses de 10 mg/kg e 0,2 mg/kg, respectivamente.

Para o emprego de tais protocolos, os animais foram pesados para o cálculo das doses anestésicas. Momentos antes da realização destes, foi realizada a tricotomia dos membros torácico direito e esquerdo, para implantação de cateter.

Foram obtidas amostras seriadas de sangue em seringas heparinizadas¹⁵, na quantidade de 3mL, através de cateter* implantado, de forma asséptica, na veia cefálica do membro torácico esquerdo. Após cada colheita, foi aplicado 1mL de uma solução de heparina³ a 10%, a fim de se evitar a obstrução do lúmen do cateter. Através do cateter implantado na veia cefálica direita foram administrados os fármacos segundo os protocolos anestésicos.

Após a colheita de todas as amostras, estas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção do plasma, e este foi estocado em *Eppendorfs* a -80°C até a realização das análises cromatográficas. Os tempos de obtenção das alíquotas sanguíneas foram: antes da aplicação (t0) e 5 (t1), 15 (t2), 30 (t3), 45 (t4), 60 (t5), 90 (t6), 120 (t7), 240 (t8), 360 (t9), 480 (t10), 600 (t11) e 720 (t12) minutos após a aplicação.

Os registros dos valores da frequência cardíaca, pressão arterial média, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, temperatura corpórea e movimentos dentro da gaiola, foram mensurados por meio da radiotelemetria, de forma contínua pela matriz de consolidação, entretanto, neste estudo, optou-se por registro de intervalos de 5 minutos, e para efeito de comparação estatística, optou-se pela utilização dos dados nos tempos 0 (t0), no momento da aplicação dos fármacos e 5 (t1), 15 (t2), 30 (t3), 45 (t4), 60 (t5), 90 (t6), 120 (t7), 240 (t8), 360 (t9), 480 (t10), 600 (t11) e 720 (t12) minutos após a aplicação.

No grupo B, já que os animais não possuíam radiotransmissores para avaliação biotelemétrica, os parâmetros como frequência cardíaca, frequência respiratória, decúbito e temperatura retal, foram aferidos manualmente antes da aplicação (t0) e 5 (t1), 15 (t2), 30 (t3), 45 (t4), 60 (t5), 90 (t6), 120 (t7), 240 (t8),

¹⁵ Liquemine® 5000 UI, Roche, Jacarepaguá, Rio de Janeiro.

360 (t9), 480 (t10), 600 (t11) e 720 (t12) minutos após a aplicação de cada protocolo.

3.4. Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo foram apresentados através das médias e desvios padrão. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos foi realizada através da aplicação do teste de Wilcoxon . Foram empregados os programas SigmaStat e GraphPad InStat®. Os cálculos das curvas de calibração e coeficiente de variação (CV%) foram realizados através do programa Origin®.

A comparação dos parâmetros clínicos foi realizada através da aplicação da análise de variância de Kruskal-Wallis e os resultados que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram submetidos ao teste de Student-Newman-Keuls, com nível de significância de 5%. Para comparação dos valores entre grupos nos diferentes tempos empregou-se o teste t de Student ($p < 0,05$). Estas análises foram realizadas com o uso do software BioStat 4.0.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da disposição cinética da cetamina S(+)

A partir da determinação das condições cromatográficas, iniciou-se a padronização do método com a construção da curva de calibração, através de injeções de diferentes concentrações de soluções de cetamina S(+) no sistema cromatográfico, necessária para a observação da linearidade de resposta e para o estudo de recuperação do método analítico. A curva foi construída com as concentrações: 0,25;0,5;1;2;4;6;8 e 10 µg/mL .

Observou-se linearidade adequada para a continuidade do estudo e aplicação do método em amostras de plasma adicionadas de cetamina S(+).

Outra curva de calibração foi construída através da análise de amostras de plasma adicionadas de cetamina S(+) estabelecendo concentração de 0,25 a 9 µg/mL, as quais foram analisadas em triplicata. Na Figura 3 demonstra-se a curva de calibração, o coeficiente de correlação e a equação da reta, e na Tabela 2 estão demonstrados os resultados de área e desvio de cada ponto da curva de calibração em plasma.

Tabela 2. Determinação da curva padrão de cetamina S(+).

Concentração teórica (µg/mL)	Área do pico	Concentração calculada (µg/mL)	Desvio (%)
0,25	19758,7	0,24	-0,024
0,5	35248,5	0,43	-13,4
1	85515,2	1,02	2,6
2	182391,6	2,16	8,49
4	304884,3	3,61	-9,6
6	521923,6	6,17	2,96
8	676164,4	7,99	-0,016
10	833593,6	9,86	-1,4

Tabela 3. Determinação das concentrações obtidas após a injeção de amostras de plasma canino adicionadas de cetamina S(+).

Concentração Teórica (µg/mL)	Área do pico	Concentração calculada (µg/mL)	Desvio (%)
0,25	7110,54	0,29	15
0,43	20806,36	0,46	6,90
1,70	121108,10	1,70	-1,07
3,70	271083,20	3,55	-3,90
5,50	424587,20	5,45	-0,88
7,30	591155,11	7,50	2,87
8,00	621222,58	7,90	-1,48
9,00	717339,44	9,07	0,77

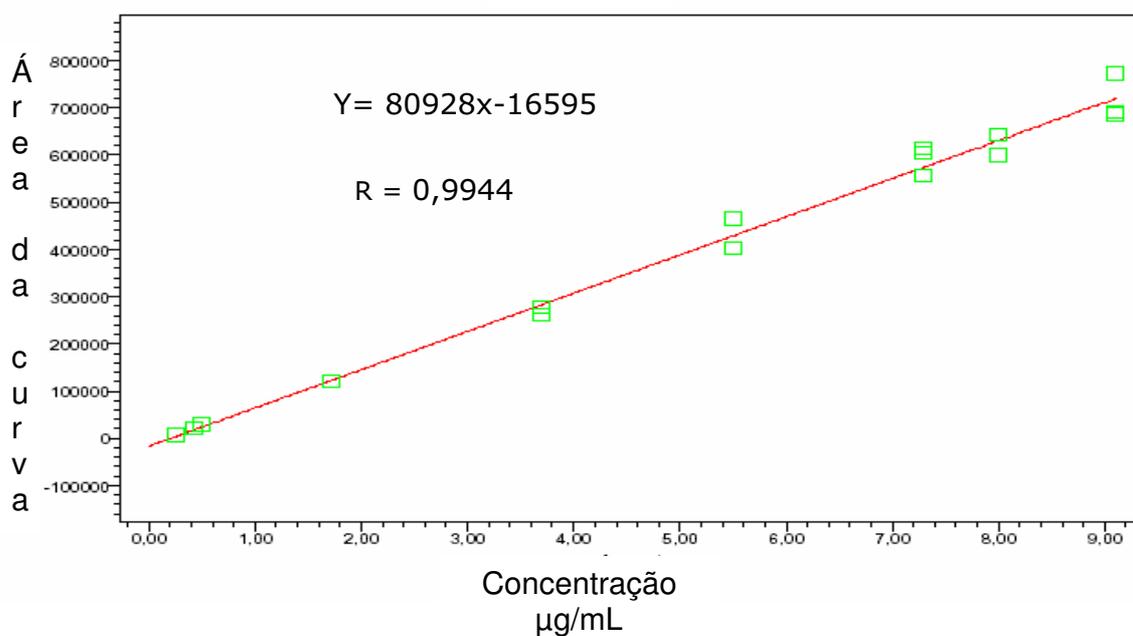


Figura 3. Curva de padrão obtida com injeção direta das soluções de cetamina S(+), utilizada como referência para a determinação da concentração de cetamina S(+) no plasma canino.

A interferência de outros fármacos no método analítico desenvolvido, foi avaliada através da injeção de soluções padrão em concentrações similares às aquelas observadas no plasma quando administrados na dose terapêutica, submetidas ao procedimento de extração estabelecido. Foram testados os

seguintes fármacos: diazepam, amitripitilina, clorpromazina, imipramina, fenobarbital, morfina, midazolam. (Tabela 4).

Tabela 4. Estudo da seletividade do método desenvolvido para a determinação de cetamina S(+) em plasma canino adicionada de cetamina S(+) na mesmas concentrações estabelecidas para a curva padrão.

Fármaco	Concentração	Tempo de retenção
Cetamina S(+)	2 µg/mL	4,0
Diazepam	300 ng/mL	ND*
Amitripitilina	70 ng/mL	ND*
Clorpromazina	100 ng/mL	2,8
Imipramina	200 ng/mL	ND*
Fenobarbital	25 µg/mL	3,1
Morfina	200 ng/mL	ND*
Midazolam	120 ng/mL	ND*

*ND: não detectado no período de 20 min.

A recuperação relativa da cetamina S(+) foi avaliada por comparação entre as áreas dos picos obtidas após extração em plasma com as áreas dos picos obtidas após procedimento de injeção direta das soluções padrão, utilizando a equação da curva padrão ($Y=84700 X=1410$), na qual “Y” corresponde à área e “X” à concentração, obtendo-se a porcentagem de recuperação. Esse estudo foi realizado através da análise, em quatro replicatas, para três concentrações da cetamina S(+): 3; 5 e 9 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5. Determinação da recuperação do método analítico em pregado para mensurar a concentração da cetamina S(+) em plasma canino.

Concentração (µg/ml)	Recuperação (X) (%)	CV (%)
3	105	6,7
5	95	4,3
9	102	7,7

As precisões intra e inter-ensaio foram avaliadas através dos coeficientes de variação obtidos pela análise de brancos de plasma adicionados de três concentrações diferentes de cetamina S(+) em triplicata, durante 5 dias consecutivos (inter ensaios), e em cinco replicatas em um mesmo ensaio (intra-ensaio). Para os estudos de precisão da cetamina S(+), as concentrações utilizadas foram de 0,5; 2 e 8 µg/mL((Tabela 6).

Tabela 6. Determinação de precisão intra e inter-ensaio do método analítico empregado para mensurara concentração de cetamina S(+) em plasma canino.

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

CV= coeficiente de variação; ES= erro sistemático

O limite de detecção foi determinado por meio da análise de amostras de plasma adicionadas de alíquotas de soluções, de diferentes concentrações de cetamina S(+), considerado como sendo a menor concentração determinável (área média três vezes maior que área do branco da amostra) de cetamina S(+),

com coeficiente de variação (CV) menor que 20%. As amostras foram analisadas em cinco replicatas (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação dos limites de detecção e de quantificação de amostras de plasma canino adicionadas de diferentes concentrações de cetamina S(+).

Limite Detecção	Cetamina S(+) ($\mu\text{g/mL}$)		CV%
	CV%	Limite Quantificação	
0,125	12,92	0,250	15

4.2. Análise farmacocinética

A determinação da concentração plasmática de cetamina S(+) nas amostras de sangue coletadas dos cães foram realizadas de acordo com o método de extração.

Na corrida analítica de todas as amostras de plasma canino colhido nos diferentes intervalos de tempo após a administração de cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam foi realizada concomitantemente às análises das amostras adicionadas de cetamina S(+) nas mesmas concentrações utilizadas para o estudo de precisão (controle de qualidade).

A curva de das médias da concentração plasmática *versus* tempo referente a cetamina S(+) está demonstrada na Figura 4. Os parâmetros farmacocinéticos da cetamina S(+) obtidos estão apresentados na Tabela 8 e Figura 5 e 6; e, como demonstrado nas mesma não houveram diferenças estatísticas entre os dois tratamentos nos parâmetros farmacocinéticos analisados.

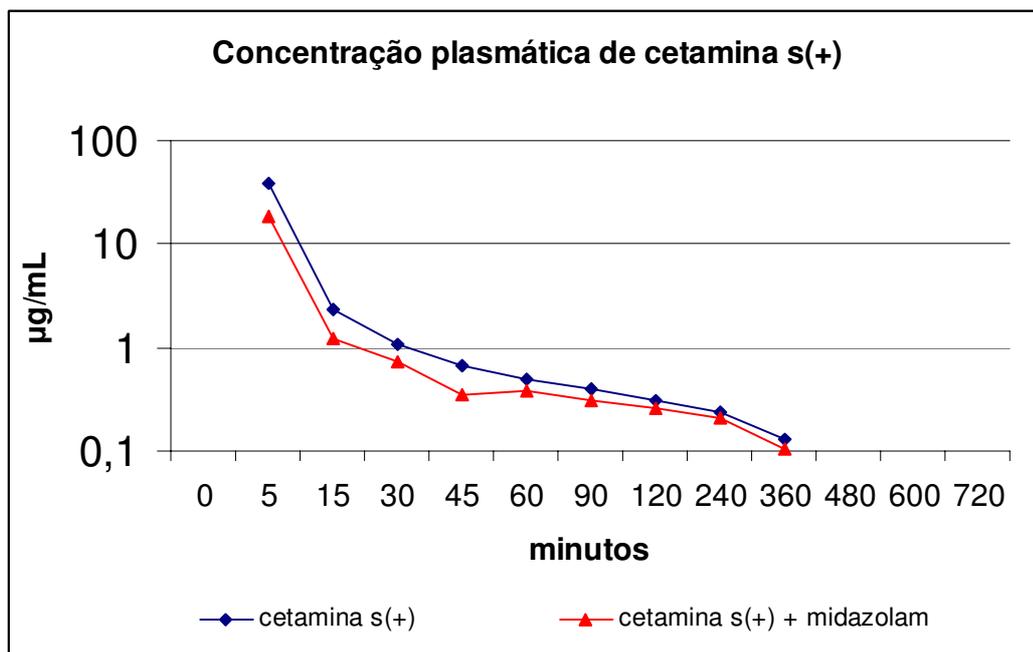


Figura 4. Curva das médias da concentração plasmática da cetamina S(+) ($\mu\text{g/mL}$) em relação ao tempo (minutos)

Tabela 8. Valores médios, desvios padrão e valor de p de parâmetros farmacocinéticos obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) (10 mg/kg) e cetamina S(+) (10 mg/kg) associada ao midazolam (0,2 mg/kg). Jaboticabal/SP, 2007.

Parâmetros	Cetamina S(+)		Cetamina S(+) + Midazolam		Valor de p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
$t_{1/2 \alpha}$ (h)	0,142a	$\pm 0,027$	0,234a	$\pm 0,075$	0,156
$K\alpha$ (h^{-1})	5,400a	$\pm 0,695$	4,200a	$\pm 1,030$	0,216
$t_{1/2 \beta}$ (h)	3,700a	$\pm 1,440$	4,060a	$\pm 1,110$	0,850
$Kel(\beta)$ (h^{-1})	0,278a	$\pm 0,065$	0,276a	$\pm 0,065$	0,985
$AUC^{0-\infty}$ ($\mu g/mL.h$)	5,540a	$\pm 1,550$	3,320a	$\pm 1,210$	0,259
Cl (L/kg.h)	2,400a	$\pm 0,580$	4,360a	$\pm 1,120$	0,092
Vd (L/kg)	9,700a	$\pm 3,180$	16,470a	$\pm 3,180$	0,058

$t_{1/2 \alpha}$: meia-vida de distribuição; $K\alpha$: constante de distribuição; $t_{1/2 \beta}$: meia-vida de eliminação; $Kel(\beta)$: constante de eliminação; $AUC^{0-\infty}$: área sob a curva; Cl: clearance e Vd: volume de distribuição.

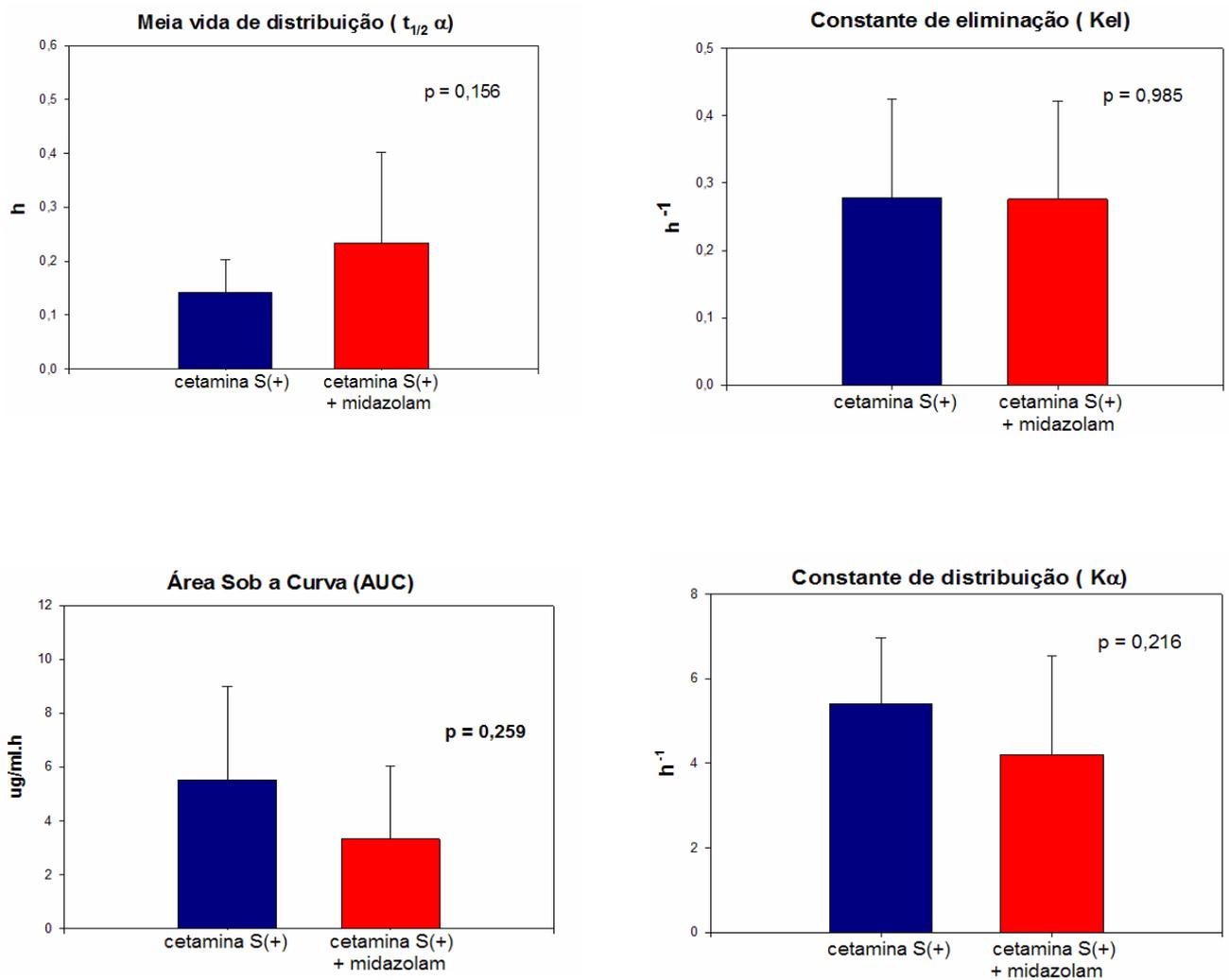


Figura 5: Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão e valor de p da meia vida de distribuição, da constante de eliminação, área sob a curva e constante de distribuição, obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

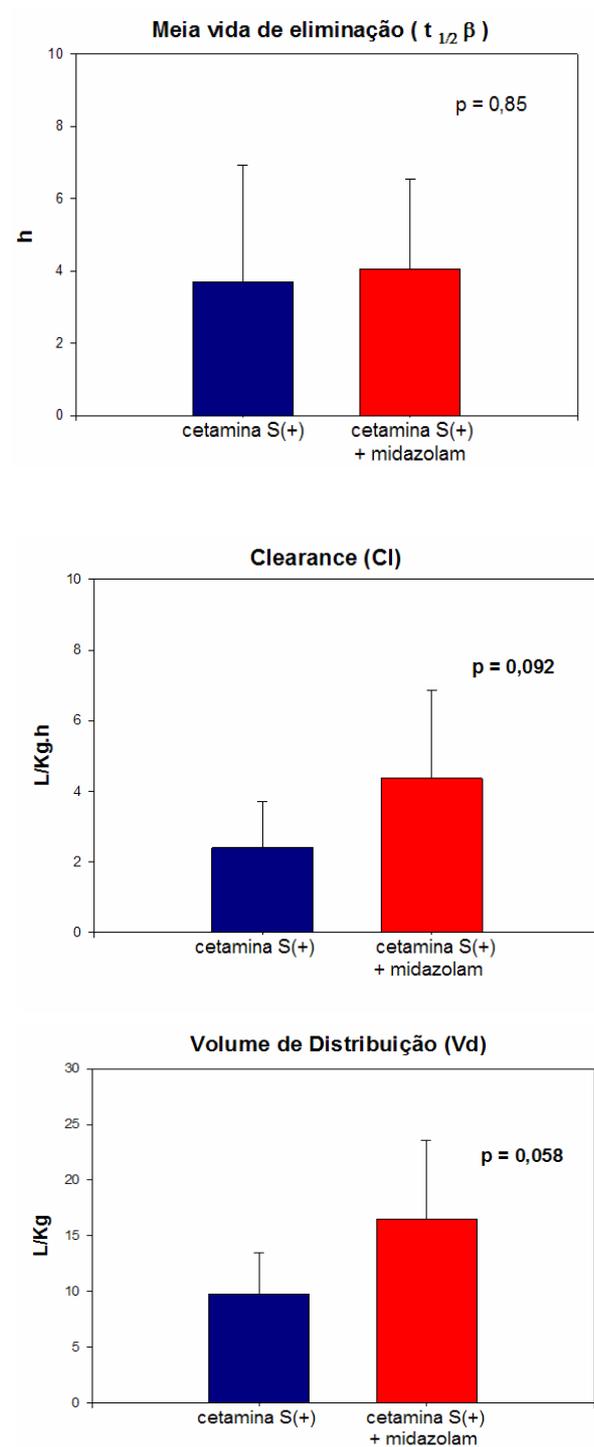


Figura 6: Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão e valor de p da meia vida de eliminação, clearance e volume de distribuição, obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em amostras plasmáticas de cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.3. Observações do período anestésico e pós-anestésico

Após a aplicação intravenosa da cetamina S(+), os animais demoraram, em média, 15 segundos para ficar em decúbito lateral. Já quando receberam a aplicação intravenosa da cetamina S(+) associada ao midazolam, demoraram em média, 12 segundos. Durante 30 minutos, os animais que receberam cetamina S(+) apresentaram intensa rigidez muscular e alguns apresentaram vocalização, fatos estes não observados quando foi utilizada a cetamina S(+) associada ao midazolam. Em ambos os protocolos, os animais mantiveram-se em decúbito externo, aos 30 minutos e em pé a partir dos 45 minutos. Após 60 minutos, os animais encontravam-se atentos e após 90 minutos encontravam-se bem espertos e andavam normalmente.

4.4. Biotelemetria

Os resultados obtidos pela aplicação da biotelemetria durante ao tratamento de cetamina S(+) (10 mg/kg) e cetamina S(+) (10 mg/kg) associada ao Midazolam (0,2 mg/kg) em cães, fêmeas, da raça Beagle estão dispostos nas tabelas 9 a 14 e figuras 7 a 9.

4.4.1 Frequência cardíaca

Comparando-se os protocolos anestésicos tempo a tempo como demonstrado pelos asteriscos, pode-se observar diferença estatística no tempo 240. Em relação às alterações ocorridas ao longo do tempo dentro do mesmo protocolo, quando os dados foram comparados aos valores basais, ou seja, ao tempo 0, pode-se observar diferença estatística nos tempos 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 para ambos os protocolos e, no tempo 240 da administração da cetamina S(+).

Tabela 9: Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	69,00 ^a	9,20	69,00 ^a	9,20
5	138,09 ^b	24,08	160,48 ^b	13,25
15	169,87 ^b	45,11	193,74 ^b	41,32
30	190,41 ^b	23,58	195,56 ^b	15,61
45	202,25 ^b	28,90	212,43 ^b	25,28
60	180,93 ^b	22,22	212,43 ^b	25,28
90	140,57 ^b	28,79	134,92 ^b	14,59
120	144,22 ^b	35,71	133,11 ^b	26,31
240	159,05 ^b	43,25	93,90 ^a *	19,20
360	124,68 ^a	30,35	92,08 ^a	12,97
480	136,73 ^a	42,35	84,65 ^a	5,49
600	107,44 ^a	13,17	95,97 ^a	23,92
720	93,87 ^a	18,87	68,35 ^a	8,83

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* - indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

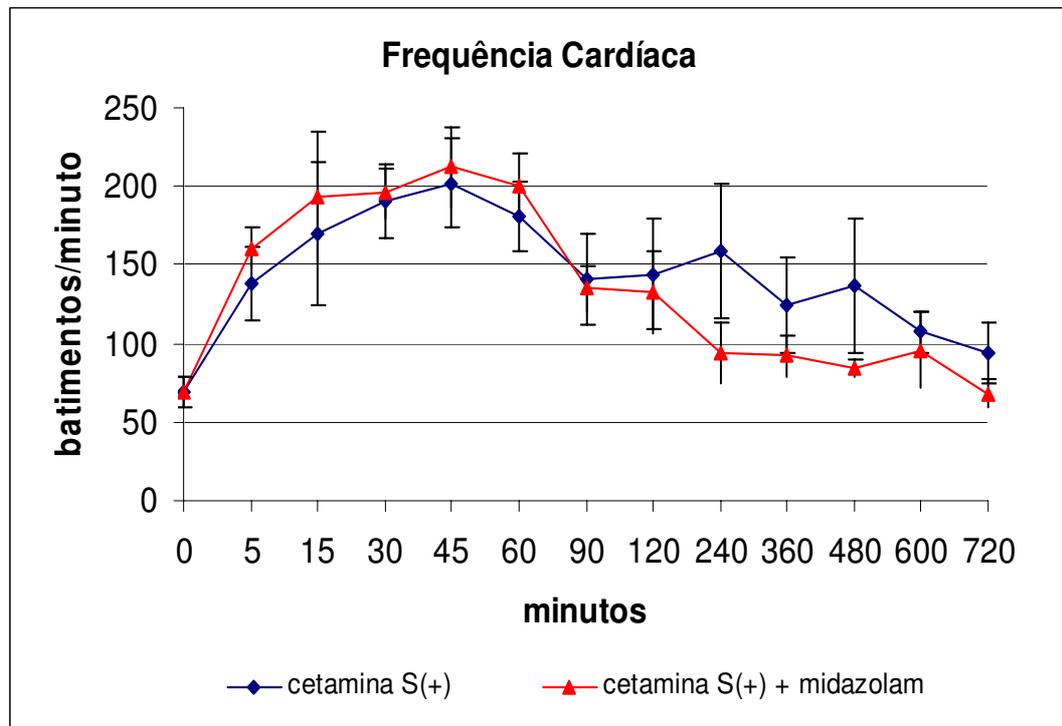


Figura 7: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos), obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.4.2 Temperatura corpórea

Ao observar os dados obtidos através da biotelemetria para temperatura corpórea, pode-se notar que não houve diferença estatística em nenhum momento, entre os protocolos e, entre os momentos dentro de cada protocolo.

Tabela 10 – Valores médios e desvios padrão da temperatura (°C) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	37,80	0,44	37,65	0,26
5	38,00	0,47	37,78	0,34
15	38,25	0,44	37,85	0,39
30	38,15	0,33	37,73	0,43
45	37,78	0,55	37,60	0,32
60	37,68	0,53	37,60	0,32
90	37,58	0,43	37,60	0,18
120	37,50	0,34	37,35	0,45
240	37,33	0,25	37,10	0,73
360	37,15	0,41	36,95	0,44
480	37,18	0,28	37,15	0,13
600	37,30	0,32	36,78	0,43
720	37,10	0,63	36,55	0,38

Não existem diferenças significativas

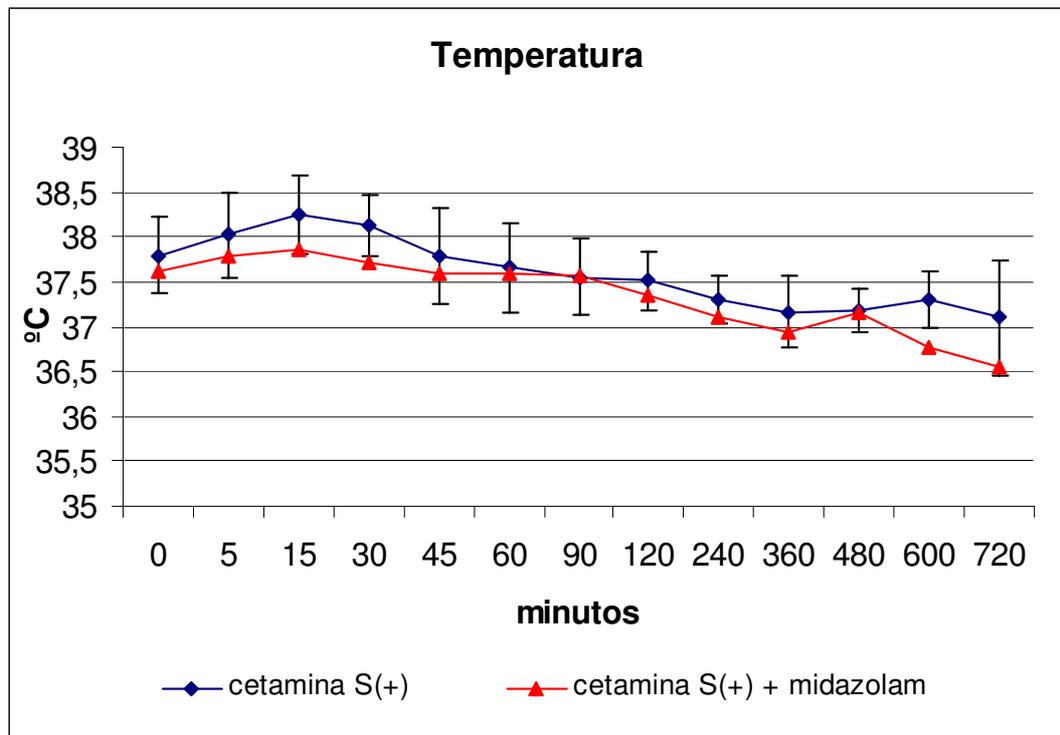


Figura 8: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para temperatura (°C) em função do tempo (minutos) obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.4.3 Movimentos dentro da gaiola

Os valores médios dos movimentos dentro da gaiola, mostraram-se diferentes estatisticamente, quando comparados entre os diferentes protocolos, nos tempos 90, 120 e 240 minutos após a aplicação, e, quando comparados os momentos dentro de cada protocolo, nos tempos 5, 15, 30, 45, 600 e 720 para ambos os protocolos e nos tempos 60, 240, 360 e 480 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam.

Tabela 11 – Valores médios e desvios padrão dos movimentos (movimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	35,35 ^a	34,68	25,50 ^a	8,85
5	4,30 ^b	5,30	4,43 ^b	3,74
15	0,65 ^b	1,30	0,53 ^b	1,05
30	3,40 ^b	4,86	0,78 ^b	0,48
45	2,48 ^b	3,19	4,18 ^b	4,30
60	8,20 ^a	7,48	4,18 ^b	4,30
90	15,98 ^a	4,13	8,23 ^{a*}	3,79
120	25,30 ^a	11,54	5,23 ^{a*}	1,79
240	18,00 ^a	21,09	2,60 ^{b*}	0,71
360	12,23 ^a	9,76	1,78 ^b	1,86
480	6,90 ^a	6,44	3,33 ^b	0,67
600	4,75 ^b	5,89	0,60 ^b	0,50
720	1,73 ^b	1,46	0,38 ^b	0,49

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

***** - indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

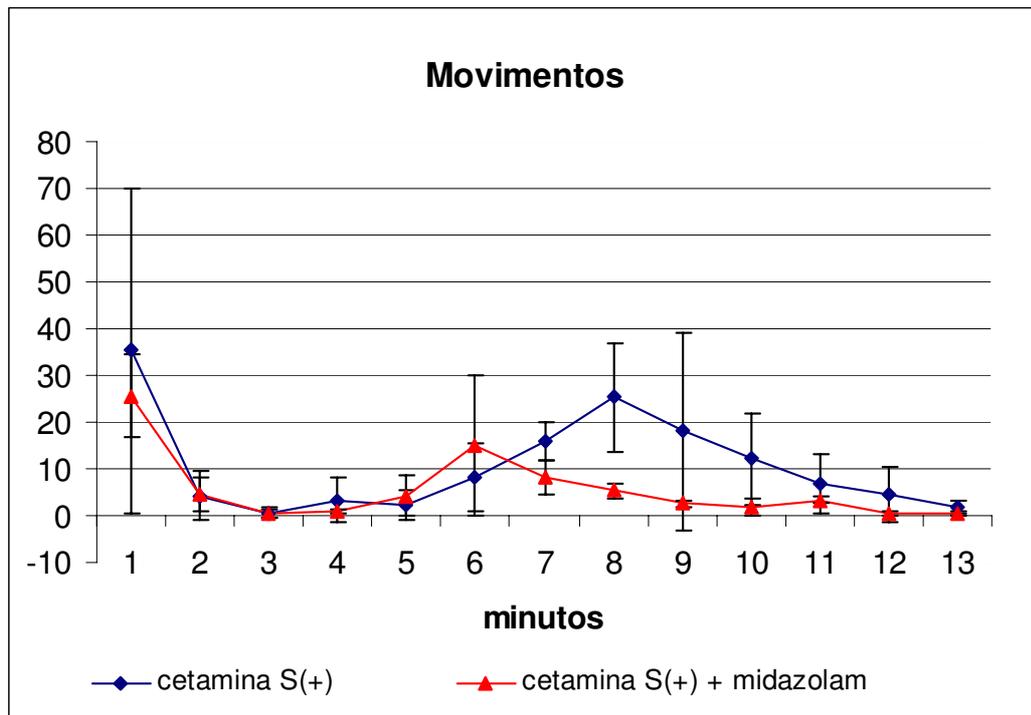


Figura 9: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para movimentos (movimentos/minuto), em função do tempo (minutos), obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.4.4 Pressão arterial média

A pressão arterial média, representada em médias na tabela abaixo, apresentou diferença estatística entre os protocolos no momento 240 e, entre os momentos 90, 120, 360, 480, 600 e 720 minutos após a administração da cetamina S(+) e nos momentos 90, 120, 240, 360, 480 e 720 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam.

Tabela 12 - Valores médios, desvios padrão da pressão arterial média (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	109,15 ^a	15,25	104,66 ^a	16,56
5	86,84 ^a	11,02	89,00 ^a	13,08
15	95,15 ^a	15,74	102,38 ^a	13,70
30	102,67 ^a	28,47	101,18 ^a	34,47
45	99,25 ^a	26,10	92,96 ^a	25,95
60	80,15 ^a	10,10	92,96 ^a	25,95
90	78,72 ^b	4,00	70,65 ^b	8,47
120	76,76 ^b	2,20	72,26 ^b	13,58
240	82,85 ^a	12,76	62,42 ^b *	4,52
360	70,71 ^b	13,41	55,20 ^b	13,22
480	77,68 ^b	17,39	52,76 ^b	7,09
600	74,19 ^b	11,70	78,92 ^a	9,44
720	62,01 ^b	7,62	60,34 ^b	9,24

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* - indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

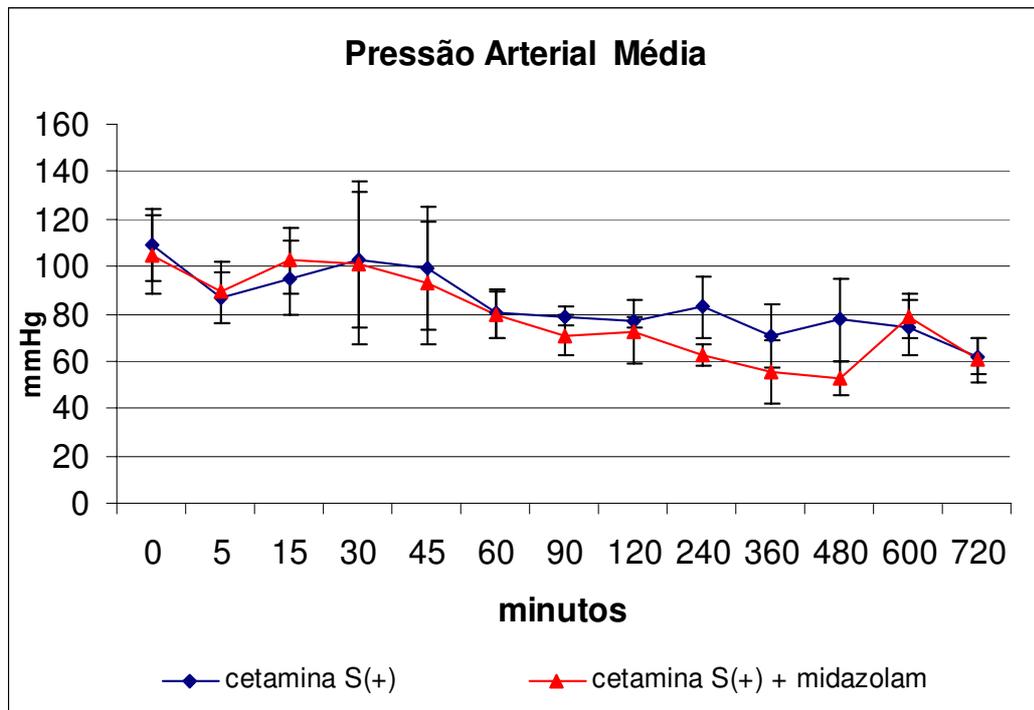


Figura 10: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial média (mmHg) em função do tempo (minutos) obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.4.5 Pressão arterial diastólica

A pressão arterial diastólica, assim como a pressão arterial média, apresentou diferença estatística entre os protocolos no momento 240 e, entre os momentos 90, 120, 360, 480, 600 e 720 minutos após a administração da cetamina S(+) e nos momentos 90, 120, 240, 360, 480 e 720 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam.

Tabela 13 – Valores médios, desvios padrão e valor de p da pressão arterial diastólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	89,27 ^a	16,60	88,05 ^a	19,11
5	70,50 ^a	11,05	75,25 ^a	14,21
15	76,27 ^a	11,66	85,05 ^a	11,57
30	84,89 ^a	29,81	84,72 ^a	34,83
45	82,85 ^a	27,94	76,51 ^a	28,44
60	63,41 ^a	10,09	63,00 ^a	11,97
90	60,98 ^b	5,69	56,26 ^b	9,92
120	58,54 ^b	6,84	57,62 ^a	14,79
240	64,01 ^a	16,07	47,74 ^b *	4,35
360	54,79 ^b	16,72	40,12 ^b	14,78
480	59,53 ^b	18,76	37,74 ^b	8,74
600	57,53 ^b	13,87	61,80 ^a	8,33
720	46,03 ^b	9,66	45,84 ^b	11,05

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* – indicam diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

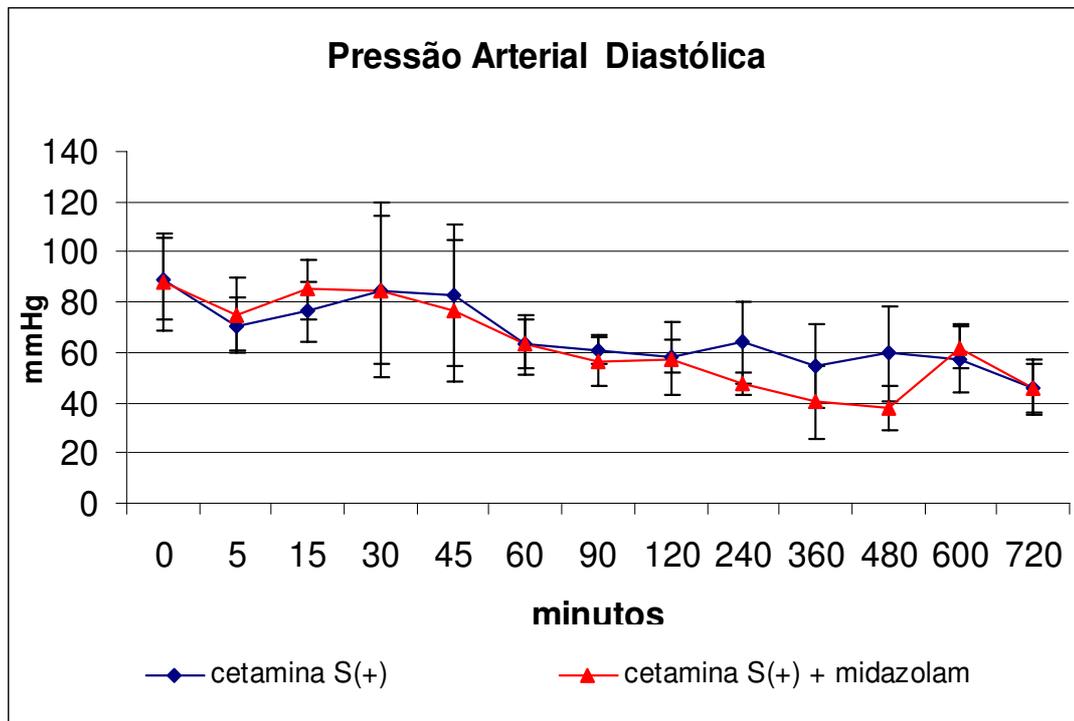


Figura 11: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial diastólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.4.6 Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica, assim como a pressão arterial média e diastólica, apresentou diferença estatística entre os protocolos no momento 240, e entre os momentos 90, 120, 240, 360, 480 e 720 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam, porém, entre os momentos, após a administração da cetamina S(+), apresentou diferença nos tempos 60, 90, 120, 360, 600 e 720 minutos.

Tabela 14 – Valores médios e desvios padrão da pressão arterial sistólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtida pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	138,24 ^a	17,23	128,19 ^a	19,39
5	109,80 ^a	11,64	108,23 ^a	11,09
15	121,99 ^a	24,34	126,00 ^a	18,13
30	129,02 ^a	27,21	124,12 ^a	34,04
45	122,54 ^a	25,63	113,30 ^a	26,75
60	103,73 ^b	12,40	100,10 ^a	12,33
90	104,04 ^b	8,02	91,33 ^b	8,58
120	101,45 ^b	4,29	93,50 ^b	14,64
240	108,92 ^a	13,20	83,89 ^b *	7,30
360	95,47 ^b	10,51	77,38 ^b	10,02
480	103,88 ^a	18,17	74,83 ^b *	3,95
600	100,67 ^b	12,38	107,23 ^a	17,25
720	85,77 ^b	7,15	82,98 ^b	5,11

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* – indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

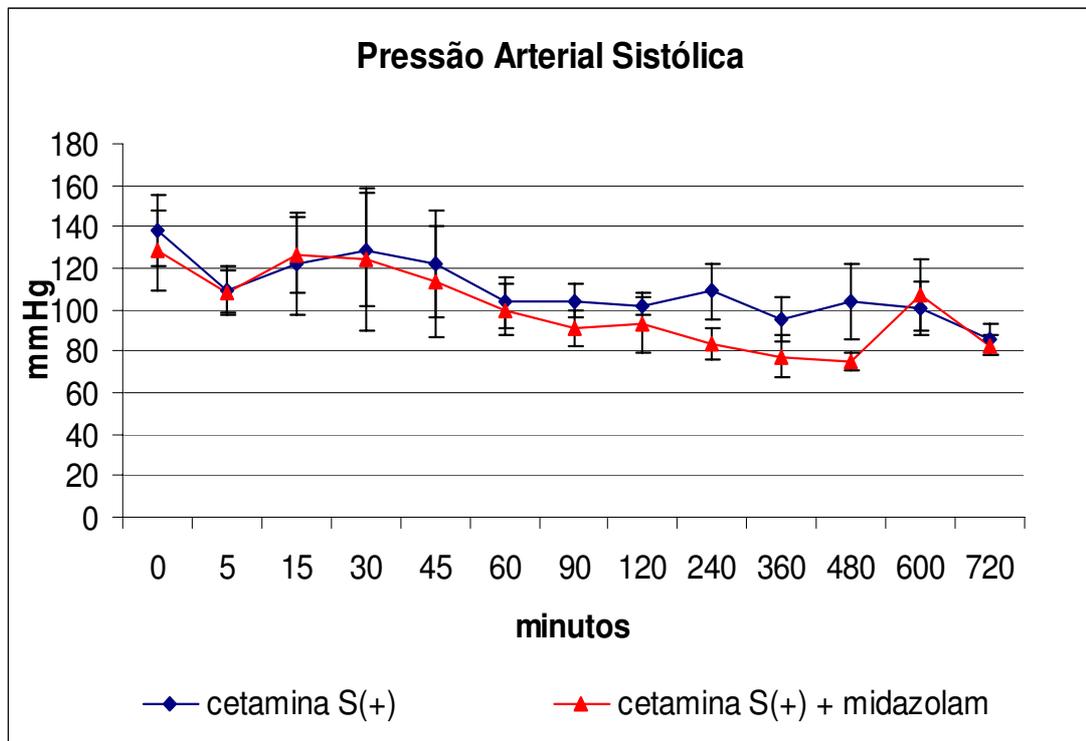


Figura 12: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para pressão arterial sistólica (mmHg) em função do tempo (minutos) obtidas pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.5 Parâmetros fisiológicos

Os resultados obtidos para frequência cardíaca, temperatura retal e frequência respiratória estão demonstrados nas tabelas 15 a 17 e figuras 10 e 11.

4.5.1 Frequência cardíaca

Os valores obtidos para frequência cardíaca através da auscultação cardíaca, mostraram-se diferentes no momento 90 minutos, quando comparados os dois protocolos e, nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 para ambos os protocolos e no tempo 90 minutos para o protocolo da cetamina S(+) associada ao midazolam, quando comparado entre os momentos do mesmo protocolo.

Tabela 15 – Valores médios e desvios padrão da frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela auscultação cardíaca em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	84,50 ^a	5,26	82,00 ^a	6,93
5	166,00 ^b	23,89	171,00 ^b	8,87
15	148,00 ^b	19,04	156,00 ^b	16,97
30	149,00 ^b	35,83	135,00 ^b	23,18
45	153,00 ^b	21,01	127,00 ^b *	9,45
60	132,00 ^b	15,32	131,00 ^b	18,29
90	97,00 ^a	11,49	140,50 ^b *	16,36
120	84,00 ^a	4,62	113,00 ^a	30,70
240	93,00 ^a	9,45	113,00 ^a	24,95
360	89,00 ^a	8,25	88,00 ^a	6,53
480	86,00 ^a	13,66	84,00 ^a	8,00
600	80,00 ^a	6,53	84,00 ^a	8,00
720	84,50 ^a	5,26	82,00 ^a	6,93

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* – indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

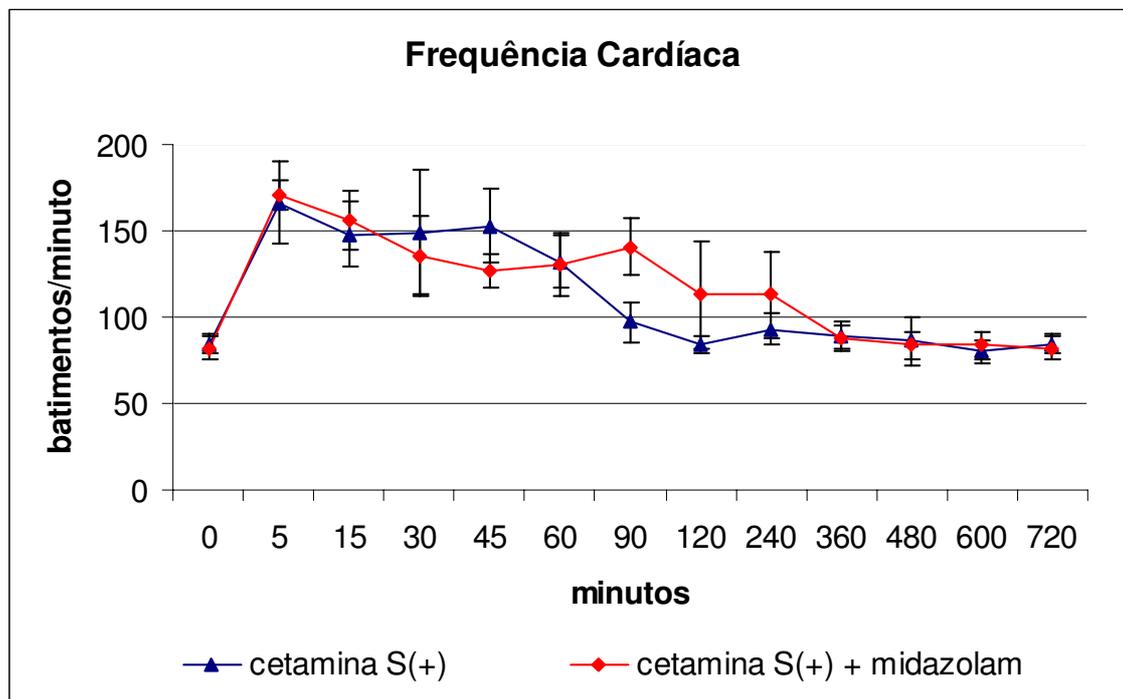


Figura 13: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtidas, respectivamente, pela auscultação cardíaca e pela aferição com um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

Podem-se comparar os valores obtidos para frequência cardíaca, utilizando-se de dois diferentes métodos para os dois grupos de animais, nos diferentes protocolos, como demonstrado nas figuras a seguir.

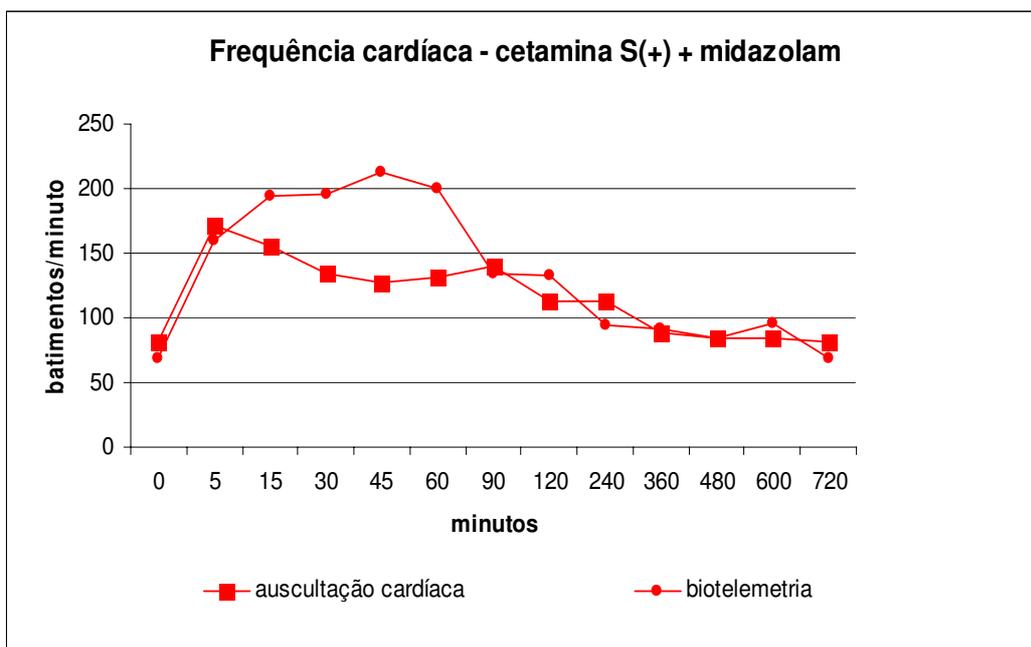
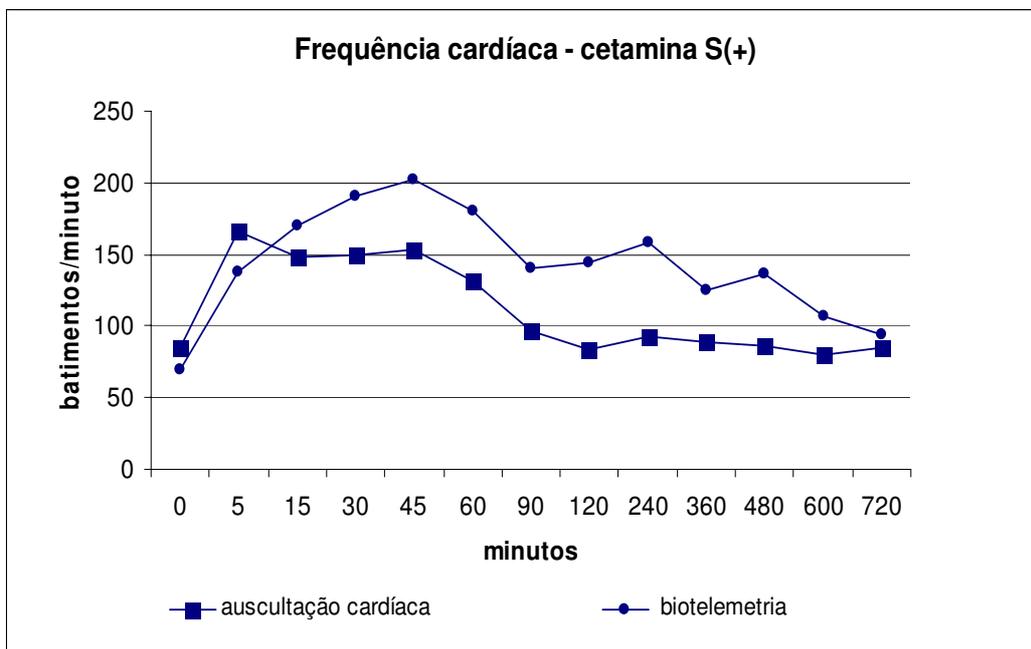


Figura 14: Representação gráfica dos valores médios para frequência cardíaca (batimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela auscultação cardíaca e pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.5.2 Temperatura retal

Ao observar os dados obtidos para temperatura retal, com auxílio de um termômetro clínico, pode-se notar que houve diferença estatística nos tempos 5, 30 e 60 minutos quando comparados os protocolos e, entre os momentos dentro de cada protocolo não houve diferenças.

Tabela 16 – Valores médios e desvios padrão da temperatura retal (°C) em função do tempo (minutos) obtida com auxílio de um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	38,73 ^a	0,05	38,53 ^a	0,21
5	39,03 ^a	0,10	38,63 ^a *	0,15
15	38,50 ^a	1,28	38,50 ^a	0,24
30	39,28 ^a	0,60	38,30 ^a *	0,41
45	39,25 ^a	0,56	38,40 ^a	0,45
60	39,20 ^a	0,18	38,48 ^a *	0,40
90	38,80 ^a	0,42	38,50 ^a	0,32
120	38,68 ^a	0,34	38,78 ^a	0,68
240	38,70 ^a	0,20	38,60 ^a	0,18
360	38,80 ^a	0,22	38,53 ^a	0,21
480	38,70 ^a	0,00	38,50 ^a	0,22
600	38,75 ^a	0,10	38,58 ^a	0,19
720	38,73 ^a	0,05	38,53 ^a	0,21

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

***** – indicam diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

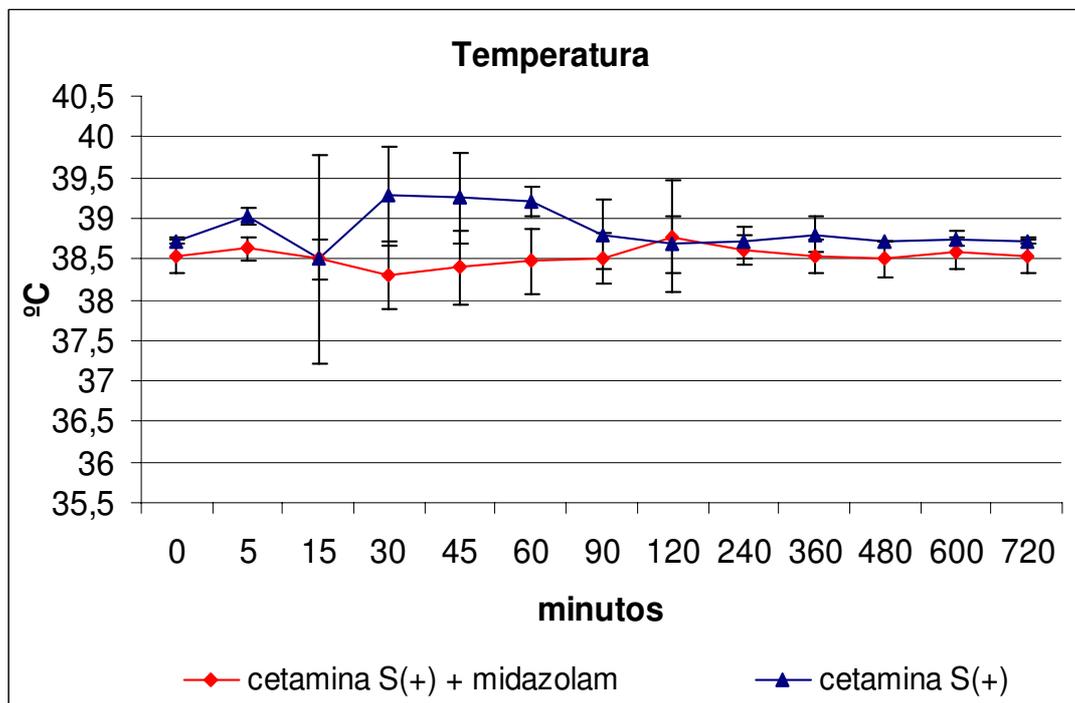


Figura 15: Representação gráfica dos valores médios e desvios padrão para temperatura (°C) em função do tempo (minutos) aferida com um termômetro clínico em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

Podem-se observar os valores obtidos para temperatura, utilizando-se de dois métodos diferentes para os dois grupos de animais, como demonstrado na figura a seguir.

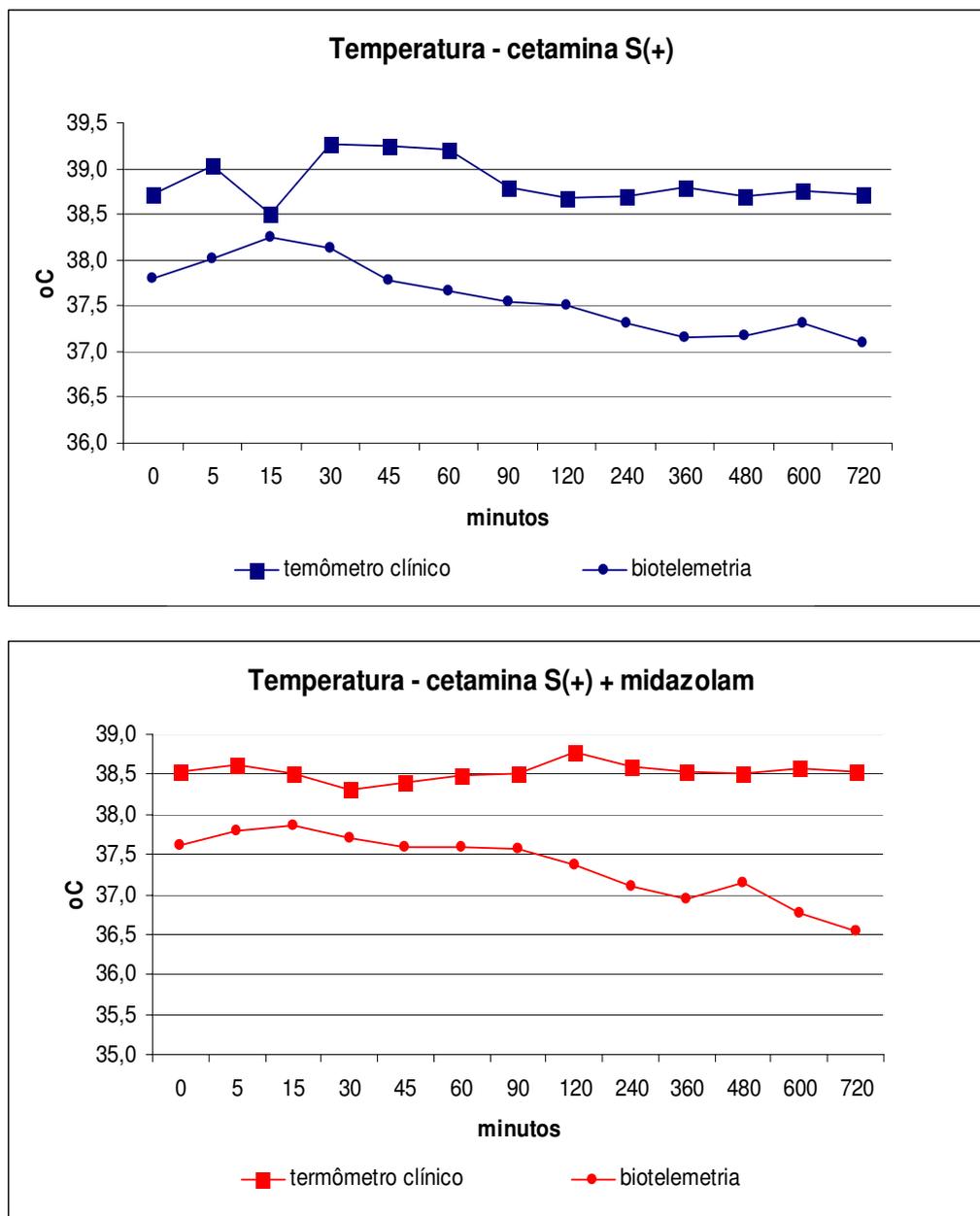


Figura 16: Representação gráfica dos valores médios para temperatura (°C) em função do tempo (minutos) obtida pela aferição com termômetro clínico e pela biotelemetria em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.5.3 Freqüência respiratória

A freqüência respiratória, obtida pela auscultação cardíaca, apresentou diferença estatística no tempo 240 quando efetuada a comparação entre os protocolos nos diferentes momentos e, nos tempos 60, 90 e 120 minutos quando efetuada a comparação entre os momentos após a aplicação de cetamina S(+) associada ao midazolam.

Tabela 17 – Valores médios e desvios padrão da freqüência respiratória (movimentos/minuto) em função do tempo (minutos) obtida pela auscultação pulmonar em cães tratados com cetamina S(+) (10 mg/Kg) e cetamina S(+) (10 mg/kg) associada ao midazolam (0,2 mg/Kg) pela via intravenosa *in bolus*. Jaboticabal/SP, 2007.

TEMPO (minutos)	CETAMINA S(+)		CETAMINA S(+) + MIDAZOLAM	
	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	23,00 ^a	4,76	20,00 ^a	0,00
5	24,00 ^a	4,62	18,50 ^a	3,00
15	26,00 ^a	12,00	24,00 ^a	4,62
30	26,50 ^a	9,98	22,00 ^a	2,31
45	25,50 ^a	9,71	22,00 ^a	2,31
60	32,25 ^a	18,55	24,00 ^b	2,83
90	29,50 ^a	14,18	25,00 ^b	4,76
120	27,00 ^a	9,45	23,00 ^b	1,15
240	25,00 ^a	3,83	20,50 ^a *	1,00
360	23,00 ^a	3,46	19,50 ^a	2,52
480	24,50 ^a	7,72	19,50 ^a	2,52
600	22,50 ^a	3,79	20,50 ^a	1,00
720	23,00 ^a	4,76	20,00 ^a	0,00

a e b – indicam diferença significativa dentro do grupo (teste Student-Newman-Keuls, $p \leq 0,05$)

* – indica diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $p \leq 0,05$)

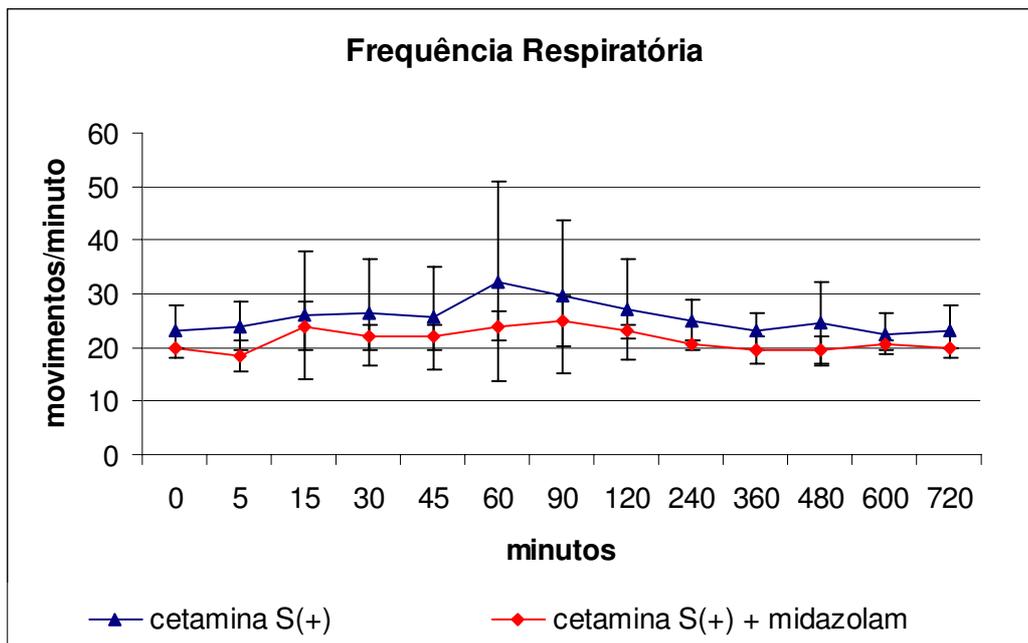


Figura 17: Representação gráfica dos valores médios, desvios padrão para frequência respiratória (movimentos/minuto) em função do tempo (minutos), obtida pela auscultação pulmonar em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

4.6 Avaliação geral dos parâmetros analisados

A seguir, podem-se observar todos os parâmetros que foram analisados neste estudo, em função do tempo, nos dois protocolos empregados.

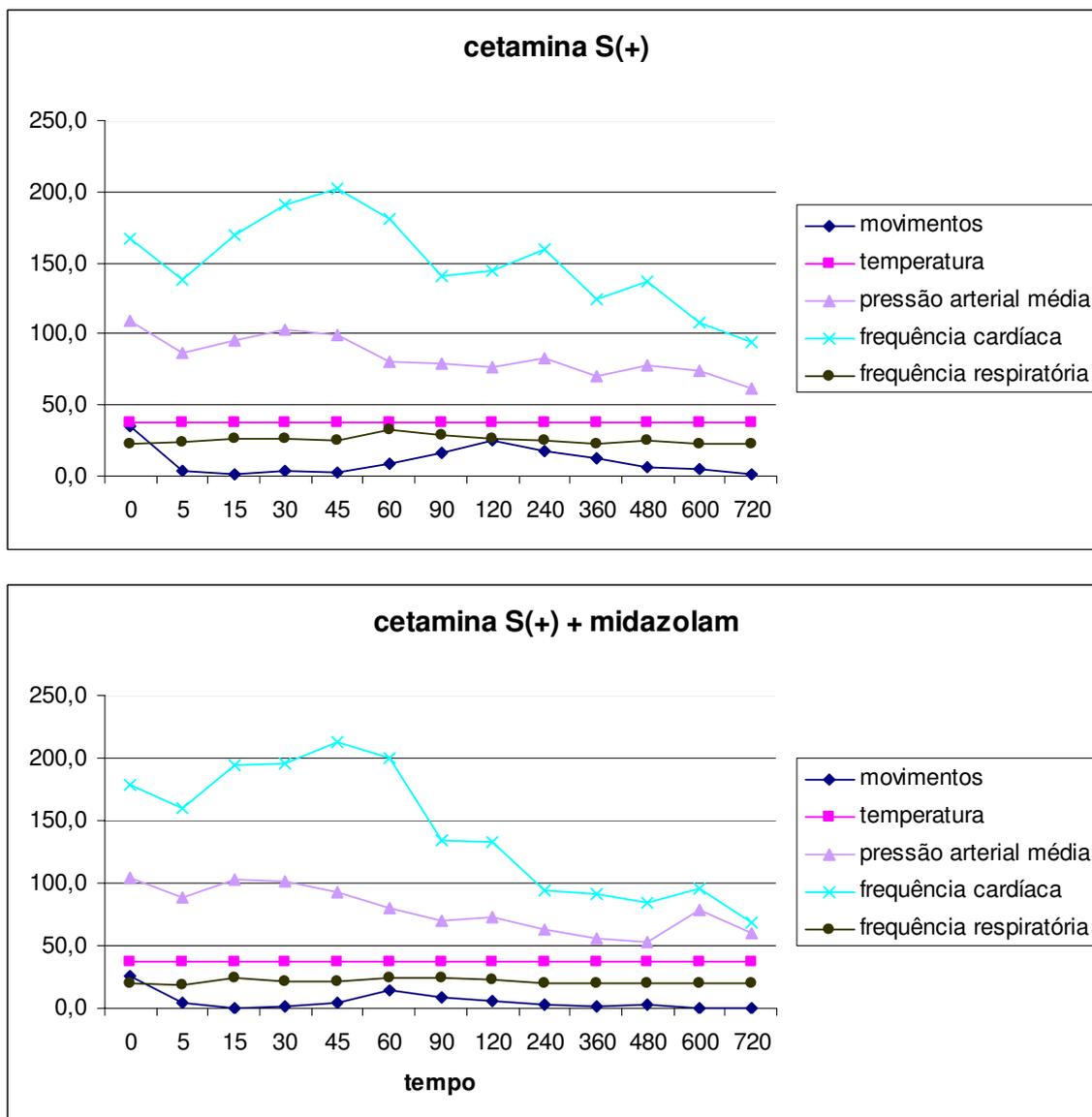


Figura 18: Representação gráfica dos valores médios para movimentos (movimentos/minuto), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (batimentos/minuto) obtidos pela biotelemetria e frequência respiratória, obtida pela auscultação pulmonar, em função do tempo (minutos), em cães tratados com cetamina S(+) isoladamente ou associada ao midazolam.

5. DISCUSSÃO

Optou-se neste estudo pela utilização da cetamina S(+), a forma pura da cetamina, pois este isômero tem um maior poder analgésico intra e pós-operatório, com menor incidência de efeitos alucinógenos (DUQUE et al., 2005). Além disso, parece ter maior afinidade de ligação aos receptores do tipo NMDA, sendo assim mais rapidamente eliminado, resultando em curta duração do efeito e recuperação mais rápida. Também foi verificado que o isômero S(+) é de duas a quatro vezes mais potente que o R(-), que por sua vez produz maiores reações emergenciais que o S(+) (MARIETTA et al., 1977). Além disso, não foram encontradas informações relativas a quantificação da cetamina S(+) em cães ou outras espécies.

Por outro lado, a cetamina, por produzir hipertonia muscular, recuperação disfórica e convulsões, tem sido utilizada em associação com sedativos ou tranquilizantes, que eliminam ou minimizam esses efeitos excitatórios (HELLYER et al., 1991). Tem-se demonstrado que a associação de cetamina e midazolam parece ser mais efetiva que a de cetamina e diazepam, na redução dessas reações, além de produzir menor efeito sobre o tempo de recuperação (VALADÃO, 2002). Desta forma, visto que a associação cetamina e midazolam traz benefícios farmacodinâmicos, é que preconizou-se estudar o perfil farmacocinético. A utilização da via intravenosa, assegura absorção total e efeito consistente, além de não produzir dor, como na via intramuscular (VALADÃO, 2002).

Por sua vez a doses de cetamina S(+) e de midazolam utilizadas neste experimento, são as mais empregadas na anestesia de cães (DUQUE et al., 2005, FANTONI & CORTOPASSI, 2002).

A utilização de veias diferentes (cefálica direita e cefálica esquerda) para a administração do fármaco e colheita das amostras, foi adotada a fim de evitar contaminação local pelo fármaco, proporcionando falsas concentrações do mesmo nas amostras iniciais.

Sobre o perfil farmacocinético da cetamina S(+), foi detectado que ela assumiu o modelo bicompartimental (com 2 meias vidas, $t_{1/2\alpha}$ e $t_{1/2\beta}$, de distribuição e de eliminação). Este mesmo modelo também foi descrito pelos autores como LANKVELD et al (2006) e KAKA E HAYTON (1980). Detectando-se concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) da cetamina S(+) aos cinco minutos em ambos os protocolos, quantificável por até seis horas após sua administração.

Os valores encontrados para os parâmetros farmacocinéticos analisados não diferiram estatisticamente, quando comparados os dois protocolos anestésicos empregados. Porém, estes dados quando comparados com os obtidos por outros autores no emprego da cetamina em diferentes espécies, foram diferentes, com exceção da $t_{1/2\alpha}$ no protocolo da cetamina S(+), que foi similar SCHWIEGER et al. (1991).

O fato de não haver diferença entre os protocolos empregados, está de acordo com a baixa ligação da proteína da cetamina S(+) no plasma (KAKA & HAYTON, 1980), pois é improvável que a competição para a ligação da proteína ocorra quando a cetamina S(+) é usada em associação com o midazolam ou com outros fármacos. Além disso, a cetamina S(+) é biotransformada pelo sistema CYP450, principalmente pela isoforma CYP2B6, ao passo que o midazolam passa pelo metabolismo oxidativo principalmente pela isoforma CYP3A nos humanos e ratos com uma menor contribuição da CYP2C11 (WHITE et al.,1982). Estes achados sugerem que não há competição entre estes fármacos para as enzimas envolvidas em cada via metabólica e, assim, isto não leva a interferência no clearance hepático. Considerando que a eliminação do fármaco é altamente dependente deste mecanismo, os valores da meia vida de eliminação não devem ser diferentes quando a associação é administrada. Isto é possível de ser observado quando o nível plasmático de cetamina S(+) for caracterizado por uma queda muito rápida, que mostra uma meia vida pequena da fase beta e uma mais curta da fase alfa, caracterizando um perfil de não acúmulo no sistema biológico. Dessa forma, pode-se afirmar que a co-administração do midazolam não interfere nestas características

farmacocinéticas, desde que haja pouca variação na concentração plasmática quando a mesma dose de cetamina S(+) foi aplicada isoladamente.

Considerando que os animais apresentaram em média 15 e 12 segundos para o decúbito, após a administração da cetamina S(+) e cetamina S(+) associada ao midazolam, respectivamente, pode-se dizer que não há diferença no tempo de latência da cetamina S(+) em associação ou não ao midazolam. O fato da concentração máxima tem sido observada aos cinco minutos, condiz com os achados clínicos neste momento.

A rigidez muscular e a vocalização observada durante os 30 minutos após a aplicação isolada da cetamina S(+) e não observada após a aplicação da associação, é condizente com as observações de ELIA & TRAMER (2005), VALADÃO (2002), HELLYER et al. (1991) e outros autores, que relatam que o midazolam minimiza os efeitos psicomiméticos da cetamina confirma-se o benefício desta associação anestésica.

Segundo VALADÃO (2002), o período anestésico da cetamina é em torno de 30 a 40 minutos e depende do tipo de pré-medicação empregada. Tal fato ocorreu no presente estudo, embora a co-administração do midazolam não tenha alterado este tempo. Por outro lado, o tempo de recuperação não foi prolongado com a associação ao midazolam, como referido por este, onde relata que a associação de benzodiazepínicos ou barbitúricos prolonga o tempo de recuperação em torno de 30%. Mas, a qualidade da recuperação anestésica foi claramente superior na associação de cetamina S(+) e midazolam, quando comparada ao emprego da cetamina S(+) isolada.

A utilização da biotelemetria como método de avaliação dos parâmetros fisiológicos, empregado nas quatro fêmeas da raça Beagle, propiciou inúmeros benefícios frente aos métodos convencionais de monitoramento empregado nos quatro machos sem raça definida, principalmente pela eliminação da interferência da contenção física ou da necessidade de procedimento anestésico visando a monitoração continuada (FARIAS et al., 2002; AMAR et al., 2002; MYAZAKY et al., 2002; LIM et al., 2001; ANDERSON et al., 1999; SADDOF et al., 1992; STÖHR, 1988). Este sistema propiciou a aferição continuada com

acurácia dos parâmetros clínicos por 12 horas permitindo, dessa maneira, avaliar a frequência cardíaca, temperatura corpórea, movimentos dentro da gaiola, pressão arterial média, pressão arterial diastólica e pressão arterial sistólica das quatro cadelas estudadas conforme descritos por vários autores que afirmam que alta confiabilidade e fidelidade dos dados, conseguidos por esta técnica, em relação aos obtidos por mensuração direta, permite uma amostra populacional bem menor quando comparado às técnicas convencionais aplicadas nos quatro machos (ARMENTANO et al. 1990; SADDOF et al., 1992; BODEY, 1996; BROWN et al., 1997; ANDERSON et al., 1999; LEFCOURT et al., 1999; MISHINA, 1999; FARIAS et al., 2002).

A frequência cardíaca, mensurada pela biotelemetria, apresentou-se uma diferença significativa, quando comparada entre os momentos dentro do mesmo protocolo, até 240 minutos após a aplicação da cetamina S(+) e até 120 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam, atingindo seus valores máximos aos 45 minutos, quando os animais começaram a voltar à posição quadrupedal. Quando mensurada pela auscultação cardíaca, a frequência cardíaca foi diferente nos 60 minutos após a aplicação da cetamina S(+) e durante 90 minutos após a administração da associação e, entre os protocolos nos momentos 45 e 90 minutos. Esse aumento da frequência cardíaca é condizente com os achados de LIN (1996) e de acordo JACOBSON & HARTSFIELD (1993), a explicação mais razoável para isto é o aumento do tono simpático, ou seja, é decorrente da ação simpatomimética da cetamina (NUNES, 1995; MASSONE, 1999). Porém, de acordo com LIN (1996), o efeito estimulante da cetamina sobre o sistema cardiovascular é minimizado ou inibido pela administração anterior ou concomitante de fármacos como benzodiazepínicos, incluindo o midazolam, o que não foi observado neste estudo, a não ser pelo fato dos valores terem diminuídos consideravelmente após 120 minutos da aplicação da associação, quando comparados com o uso isolado da cetamina S(+). A diferença encontrada entre os dois métodos de mensuração pode ser justificado pela eficiência do método de biotelemetria, comparado a auscultação cardíaca e, pelo fato de serem animais de raças

diferentes, sendo que os animais sem raça definida são muito mais calmos e menos agitados que os da raça Beagle, utilizados neste estudo.

Em relação à pressão arterial, inúmeros autores como TRABER et al. (1968) e GASSNER et al. (1974), afirmam que a cetamina tem ação hipertensiva, fato não observado neste estudo, onde os momentos diferentes estatisticamente do valor basal, estavam abaixo deste, e ocorreram após o período anestésico, ou seja, após 60 minutos. Diante do observado pode-se afirmar que pelo menos para a cetamina S(+), este efeito não ocorre.

A temperatura, tanto a aferida pela biotelemetria quanto àquela obtida com o auxílio de um termômetro clínico, manteve-se estável nos protocolos, o que corrobora os achados de BRONDANI et al. (2003) na utilização da associação cetamina-midazolam. Porém, difere dos dados obtidos por HELLYER et al. (1991) que observaram diminuição significativa na temperatura corporal, caracterizada por hipotermia. Por outro lado, pode-se observar que a temperatura obtida durante o protocolo no qual utilizou-se a cetamina S(+) isolada, foi significativamente maior do que a observada na associação, fato este que pode ser comprovado pela diferença estatística entre os protocolos, nos momentos 5, 30 e 60 minutos, que corresponde ao período anestésico, corroborando HASKINS et al. (1985) que observaram aumento da temperatura corporal, atribuído à atividade muscular, quando a cetamina é utilizada isoladamente.

A frequência respiratória, obtida pela auscultação pulmonar, foi diferente estatisticamente nos momentos 60, 90 e 120 minutos após a aplicação da cetamina S(+) associada ao midazolam e no momento 240 minutos entre os protocolos empregados. Mas durante o período anestésico, até os 60 minutos, não ocorreram alterações, o que reforça as citações de ser a cetamina o agente anestésico que menos induz à depressão respiratória (BOOTH, 1992). Tais diferenças poderiam ser explicadas, talvez, por um aumento da atividade dos animais. A diferença encontrada no momento 240, por não estar relacionada com os efeitos da cetamina, uma vez que sua concentração neste momento era mínima.

A atividade na gaiola, obtida pelo sistema de biotelemetria, coincidiu com as alterações clínicas e cinéticas da cetamina S(+), pois antes da aplicação dos anestésicos o movimento dentro da gaiola era mais intenso, visto que os cães da raça Beagles geralmente são agitados. Porém, logo após a administração dos anestésicos, este parâmetro diminuiu consideravelmente e manteve-se desta maneira durante o período anestésico. O movimento tornou a diminuir aos 600 minutos após aplicação da cetamina S(+) e a partir dos 240 minutos após a aplicação da associação, que pode ser explicado pelo horário da realização do estudo, que correspondia, nestes momentos, ao período noturno e, assim, as cadelas encontravam-se dormindo.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos com a metodologia usada, pode-se concluir que:

1. A técnica de HPLC, mostrou-se efetiva na quantificação dos níveis plasmáticos da cetamina S(+).
2. O midazolam, quando associado à cetamina S(+), produz anestesia estável e isenta de efeitos adversos.
3. O sistema de biotelemetria , permitiu uma avaliação continuada e confiável dos parâmetros clínicos sem exigir a contenção física dos animais.
4. As alterações clínicas apresentadas após a administração intravenosa da cetamina S(+), coincidiram com a biodisponibilidade do fármaco, comprovada pela análise farmacocinética.
5. O efeito clínico observado na associação da cetamina S(+) ao midazolam é devido à interação farmacodinâmica.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, H.A.; THIEL, A.; JUNG, A.; et al. Effects of S-(+)-ketamine on endocrine and cardiovascular parameters – Recovery and psychomimetic reactions in volunteers. *Anaesthetist*, v.41, p. 588-596, 1992.,
- AMAR, D. et al. The effects of advanced age on the incidence of supraventricular arrhythmias after pneumonectomy in dogs. *Anesthesia and Analgesia*, v.94, p. 1132-1136, 2002
- ANDERSON, N. H. Telemetry for cardiovascular monitoring in a pharmacological study: New approaches to data analysis. *Hypertension*, v. 33, n. 1, p. 248-255, 1999.
- ARMENTANO, R. Telemetry of Aortic Pressure in Unrestrained Animals: Validation of the Method Over a Wide Range of Blood Pressure (from 40 to 200 mmHg). *Med. Prog. Tec.*, v. 16, n. 3, p. 125-129, 1990.
- BERGMAN, A.S. Ketamine: review of its pharmacology and its use in pediatric anesthesia. *Anesthesia Progress*, v.46, p. 10-20, 1999.
- BODEY, A. R. Comparison of direct and indirect (oscillometric) measurements of arterial blood pressure in conscious dogs. *Rev. Vet. Sci.*, v. 61, n. 1, p. 17-21, 1996.
- BOLZE, S.; BOULIEU, R. HPLC determination of ketamine, norketamine, and dehydronorketamine in plasma with a high-purity reversed-phase sorbent. *Clin. Chem.*, v.44,p.560-564, 1998.
- BOOTH, N.H. Analgésicos não narcóticos. In: BOOTH, N.H.; MCDONALD, L.E. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.16, p.262-288, 1992.
- BOROUJERDI, M. Noncompartmental Approach in pharmacokinetics Based on Statistical Moments. In: *Pharmacokinetics Principles and applications*. *Mc Graw-Hill*, p.331-341, 2002.
- BRÄU, M.; SANDER, F.; VOGEL, W.; et al, Blocking mechanisms in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. *Anesthesiology*, v.86, n.2, p. 394-404, 1997.

BRONDANI, J.T.; NATALINI, C.C.; PIPPI, N.L.; et al. Anestesia com cetamina, midazolam e óxido nitroso em cães submetidos à esofagoplastia cervical. *Ciência Rural*, v. 33, n.6, p.1075-1080, 2003.

BROOKS, D. Validation of a telemetry system for long-term measurement of blood pressure. *J. Applic. Phvsiol.*, v. 81, n. 2, p. 1012-1018, 1996.

BROWN, S.A. et al. Effects of certain vasoactive agents on the long-term pattern of blood pressure, heart rate, and motor activity in cats. *Am. J. Vet. Res.*, v.58, n.6, p.647-652,1997.

COOK, D.J.; CARTON, E.G.; HOUSMANS, P.R. Mechanism of the positive inotropic effect of ketamine in isolated ferret ventricular papillary muscle. *Anesthesiology*, v.74, p. 880-888, 1991.

DELEFORGE, J.; DAVOT, J.L.; BOISRAME, B.; et al. Enantioselectivity in the anaesthetic effect of ketamine in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.14, p.418-420, 1991.

DOENICKE, A.; ANGSTER, R.; MAYER, M.; et al. Hemodynamics, plasma-catecholamine and cortisol-levels after ketamine racemate and S(+)-ketamine. *Anaesthetist*, v.41, p. 597-603, 1992.

DOMINO, E.F.; ZSIGMOND, E.K., DOMINO, L.E., DOMINO, K.E., et al. Plasma levels of ketamine and two of its metabolites in surgical patients using assay a gas chromatography mass fragmentaographic. *Anesthesia and analgesia*, v.61, p.87-92, 1982.

DOWDY, E.G.; KAYA, I. Studies of the mechanism of cardiovascular responses to CL-581. *Anesthesiology*, v.29, p. 931-943,1968.

DUQUE, J.C.; GUIRRO, E.; OLESKOVICZ, N.; et al. Determinação da potência relativa da cetamina S(+), em cães.In: VII ENCONTRO EM ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2005, São Luís. Anais...São Luís: *Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária*, p. 157, 2005.

ENGELHARDT, W.; STAHL, K.; MAROUCHE, A.; et al. Recovery after short anaesthesia with (S)- or racemic ketamine in volunteers: a randomized, double-blind, cross-over study. *Anaesthetist.*, v.47, n.3, p.184-192, 1998.

FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R; *Anestesia em cães e gatos*. Ed. Roca: São Paulo, p. 151-158, 2002.

FARIAS, A. et al. *Monitoramento continuado de coelhos tratados com amitraz ou xilazina por técnica de biotelemetria*. In: XXIX CONBRAVET, 2002, Gramado, meio digital –CD, 2002.

FUHR, U.; Induction of drug metabolizing enzymes: pharmacokinetic and toxicology consequences in humans. *Clin Pharmacokinet.* v.38, n.6, p. 493-504, 2000.

GASSNER, S.; COHEN, M.; AYGEM, M.; et al.. The effect of ketamine on pulmonary artery pressure, *Anaesthesia*, v. 29, p. 141-146, 1974.

GILL, R.; High pressure liquid chromatography. In *Clarke,s isolation and identification of Drugs*. Ed. The pharmaceutical Press. London, p. 201-220, 1986.

HARDMAN, J.E.; LIMBIRD, L.E. In: *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10^o edição. Rio de Janeiro: McGraw-hill Interamericana do Brasil Ltda, p. 257-272, 2004.

HASKINS, S.C.; PATZ, J.D. Ketamine in hypovolemic dogs. *Critical Care Medicine*, v.18, p.625-629, 1990.

HASKINS, S.C.; COPLAND, V.S; PATZ, J.D. The cardiopulmonary effects of oxymorphone in hypovolemic dogs. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.*, v.1, p.32-38, 1991.

HASKINS, S.C.; FARVER, T.B.; PATZ, J.D. Ketamine in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, p. 1855-1860, 1985.

HELLYER, P.W.; FREEMAN, L.C.; HUBBELL, J.A. Induction of anesthesia qith diazepam-ketamine and midazolam-ketamine in greyhounds. *Veterinary Surgery*, v.20, n.2, p.143-147, 1991.

IHMSEN, H.; GEISLINGER, G.; SCHUTTLER, J. Stereoselective pharmacokinetics of ketamine: R(-)-ketamine inhibits the elimination of S(+)-ketamine. *Clin. Pharmacol. Therap.*, v.70, p.431-438, 2001.

JACOBSON, J.D.; HARTSFIELD, S.M. Cardiovascular effects os intravenous bolus administration and infusion of ketamine-midazolam in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, n.10, p.1710-1714, 1993.

KAKA, J.S.; KLAVANO, P.A.; HAYTON, W.L. Pharmacokinetics of ketamine in the horse. *American Journal of Veterinary Research*, v.50, p.978-981, 1979.

KAKA, J.S.; HAYTON, W.L. Pharmacokinetics of ketamine and two metabolites in the dog. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*, v.8, p. 193-202, 1980.

KANELLOPOULOS, A.; LENZ, G.; MUHLBAUER, B. Stereoselective differences in the vasorelaxing effects of S(+) and R(-) ketamine on rat. *Anesthesiology*, v.88, p. 718-724, 1998.

KHARASCH, E.D.; LABROO, R. Metabolism of ketamine stereoisomers by human liver microsomes. *Anesthesiology*, v.77, p. 1201-1207, 1992.

KIENBAUM, P.; HEUTER, T.; PAVLAKOVIC, G.; et al. S(+)-Ketamine increases muscle sympathetic activity and maintains the neural response to hypotensive challenges in humans. *Anesthesiology*, v. 94, p. 252-258, 2001.

KONSAYREEPONG, S.; COOK, D.J.; HOUSMANS, P.R. Mechanisms of the direct, negative inotropic effect of ketamine in isolated ferret and frog ventricular myocardium. *Anesthesiology*, v.79, p. 313-322, 1993.

LANDONI, M.F.; SORACI, A. L.; DELATOUR, P.; et al. Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals: a review. *J.Vet. Pharmacol. Therap.*, v.20, p. 1-16, 1997.

LANKVELD, D.P.K.; BULL, S.; VAN DIJK, P.; FINK-GREMME, J.; HELLEBREKERS, L. Ketamine inhibits LPS-induced tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in equine macrophage cell line. *Veterinary Research*, v.36, p.257-262, 2005.

LAURETTI, G. R.; LIMA, I. C.; BUSCATTI, R. Y.; et al. Avaliação clínica, hemodinâmica, analgésica, psicodélica e anestésica de cetamina racêmica versus seu S(+) isômero. *Rev. Bras. Anest.*, v.50, p.357-362, 2000.

LEFCOURT, A. M., A noninvasive radiotelemetry system to monitor heart rate for assessing stress responses of bovines. *J. Dairv Sci.*, v. 82, n. 6, p. 1179-87, 1999.

LERMAN, J.; SCHMITT-BANTEL, B.I.; GREGORY, G.A.; et al. Effect of age on the solubility of volatile anesthetics in human tissues. *Anesthesiology*, v.65, p. 307-312, 1986.

LIN, H.C. Dissociative anesthetics. In: Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ. Eds. *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia*, 3 ed. Philadelphia: Lea & Feabiger, p.241-296, 1996.

LIM, J.J. et al. Measuring stress responses using active biotelemetry in cattle. I. Restraint stress responses in heifers and cows, *Korean J. Vet. Res.*, v.41, p.597-602, 2001.

MARIETTA, M. P.; WAY, W. L.; CASTA, N.; et al. On the pharmacology of ketamine enantiomorphs in the rat. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, v. 202, p.257-263, 1977.

MASSONE, F. *Anestesiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999, 252p.

MISHINA, M. Diurnal variation of blood pressure in dogs. *J. Vet. Med. Sci*, v. 61, n. 6, p. 643-647, 1999.

MUIR, W.W.; HUBELL, J.A.E. Cardiopulmonary and anesthetic effects of ketamine and its enantiomers in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49, p. 530-534, 1988.

MULLENHEIM, J.; FRABDORF, J.; PRECKEL, B.; et al. Ketamine, but not S(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology*, v.94, n.4, p.630-636, 2001.

MYAZAKY, H. et al. Ranges of diurnal variation and the pattern of body temperature, blood pressure and heart rate in laboratory beagle dogs. *Exp. Anim.*, v.1, p.95-98, 2002.

NAU, C.; STRICHARTZ, G.R. Drug chirality in anesthesia. *Anesthesiology*, v.97, p.497-502, 2002.

NUNES, N. Efeitos cardiocirculatórios da associação de quetamina e levomepromazina, em cães (*Canis familiaris*) pré-tratados ou não pelo propanolol. Botucatu, 1995, 146p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995.

OGA, S.; BASILE, A. C. *Medicamentos e suas interações*. São Paulo: editora Atheneu, p.11-20, 2002.

OKLU, E.; BULUTCU, F.S.; YALCIN, Y.; et al. Which anesthetic agent alters the hemodynamic status during pediatric catheterization? Comparison of propofol versus ketamine. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, v.17, p. 686-690, 2003.

OLESKOVICZ, N.; VALADÃO, C.A.A.; DUQUE, J.C. et al. Preemptive effects of epidural S(+) ketamine or ketamine in the horse's post-incisional pain. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.1, p.24-32, 2006.

PFENNINGER, E.; HIMMELSEHER, S. Neuroprotective effects of ketamine on a cellular level. *Anaesthetist*, v.46, s.1, p. S47-S54, 1997.

PROESCHOLDT, M.; HEIMANN, A.; KEMPSKI, O.; et al. Neuroprotection of S(+)-ketamine isomer global forebrain ischemia. *Brain Research*, v. 22, p.245-251, 2001.

REDER, B.S.; TRAPP, L.D.; TROUTMAN, K.C. Ketamine suppression of chemically induced convulsions in the two-day-old white leghorn cocktel. *Anesthesia and Analgesia*, v.59, p. 406-409, 1980.

REIS-OLIVEIRA, M.P.; NICOLETTI, R.L.; FELÍCIO, A.A.; et al. Efeitos cardiovasculares da quetamina em cães hipovolêmicos. *Rev. Bras. Anest.*, v.30, p.167-172, 1980.

RYDER, S.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. Comparative pharmacology of the optical isomers of ketamine in mice. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, v.212, p.198-202, 1978.

RUST, M.; LANDAUER, B.; KOLB, E. Stellenwetr von ketamin in der notfallsituation. *Anaesthesist*, v.27, p.205-212, 1978. (Abstract).

SADDOF, D. A. Chronic blood pressure radiotelemetry in rhesus macaques. *Labor. Anim. Sci.*, v. 42, n. 1, p. 78-80, 1992.

SCHWENDER, D.; FABER-ZÜLLING, E.; FETT, W.; et al. Mid-Latency auditory evoked potentials in humans during anesthesia with S (+) ketamine - a double-blind randomized comparison with racemic ketamine. *Anesth. Analg.*, v.78, p.267-274, 1994.

SOLIMAN, M.G.; BRINALE, G.K.; KUSTER, G. Response to hypercapnia under ketamine anesthesia. *Canadian Anaesthesia Society Journal*, v.22, p. 486-494, 1975.

SOUZA, A.P.; CARARETO, R.; NUNES, N.; et al. Eletrocardiografia em cães anestesiados com cetamina S(+) ou cetamina. *Ciência Rural*, v.32, p. 787-791, 2002.

STOHR, W. Longterm heart rate telemetry in small mammals: a comprehensive approach as a prerequisite for vaiid results. *Physiological and Behavior*, v. 43, n. 5, p. 567-576, 1988.

STRUMPER, D.; GOGARTEN, W.; DURIEUX, M.E.; et al. The effects of S(+)-ketamine and racemic ketamine on uterine blood flow in chronically instruments pregnant sheep. *Anaesthesia and Analgesia*, v.98, p. 497-502, 2004.

SCHWIEGER, I.M., SZLAM, F.; HUG, C.C. Jr. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketamine in dogs anesthetized with enflurane. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v. 19, p.145-156, 1991.

TRAEBER, D.L.; WILSON, R.D.; PRIANO, L.L. Differentiation of the vascular effect of CI-581. *Anesthesia and Analgesia*, v. 47, p.769-778, 1968.

TRUETT, A. A.; WEST, D. B. Validation of a Radiotelemetry System for Continuous Blood Pressure and Heart Rate Monitoring in Dogs. *Lab. Anim. Sci.*, v. 45, n. 3, p. 299-302, 1995.

VALADÃO, C.A.A. Anestésicos dissociativos. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R. *Anestesia em cães e gatos*. Ed Roca: São Paulo, p.165-173, 2002.

VALADÃO, C.A.A.; PACCHINI, C.E. Efeitos cardiorrespiratórios da tiletamina-zolazepam em cães hipovolêmicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.44-51, 2001.

WATERMAN, A.; LINVINGSTON, A. Studies on the distribution and metabolism of ketamine in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 1, p.141-147, 1987.

WHITE, P.F.; WAY, W.L.; TREVOR, A.J. Ketamine – Its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology*, v.56, p.119-136, 1982.

WINTER, M.E.; *Basic Clinical Pharmacokinetics*. Second Edition. Applied Therapeutics Inc, Vancouver, Canada, 1988.

ZIELMANN, S.; KAZMAIER, S.; SCHNULL, S.; et al. Circulatory effects of S(+)-ketamine. *Anaesthetist*,v.46, S43-S46, 1997.