

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM
Centro De Ciências Agrárias
Departamento de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal

VICTÓRIA PARADELA PEREIRA MOTTA

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LIGAÇÃO DA CETAMINA ÀS PROTEÍNAS
TOTAIS DO PLASMA DE GATOS DOMÉSTICOS PELO MÉTODO HPLC-ESI-
MS/MS

UMUARAMA
ESTADO DO PARANÁ
AGOSTO/ 2022

VICTÓRIA PARADELA PEREIRA MOTTA

Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pelo método HPLC-ESI-MS/MS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Farmacologia Veterinária

Linha de pesquisa: Produção Sustentável

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Co-orientadora: Profa. Dra. Marilda Onghero Taffarel

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Diniz

Umuarama

2022

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL**

TERMO DE APROVAÇÃO
VICTÓRIA PARADELA PEREIRA MOTTA

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, área de concentração Saúde Animal, campus avançado de Umuarama, Universidade Estadual de Maringá, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas
Presidente/ Orientador: Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Ícaro Putinhon Caruso
Membro: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Prof. Dr. Eduardo Cesar Meurer
Membro: Universidade Federal do Paraná, Campus Jandaia do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família. Especialmente os meus pais, Alessandra e Vicente, pois sem vocês eu nada seria. Reconheço, honro e sou grata diariamente e para sempre, por ter vivido em um ambiente de afeto, aconchego, apoio e suporte que foi proporcionado por vocês. O que sou, e todas as minhas conquistas, são dedicadas a vocês. Obrigada por tudo!

Obrigada ao meu irmão, Felipe, por tudo o que vivemos juntos e por ter me protegido sempre que pôde.

À todas as minhas tias, que mesmo longe, sempre se fizeram presentes.

Vó Iná, te carrego comigo por onde eu for. Sinto sua falta sempre! Vô, Zé Maria, espero que daí de cima se orgulhe do caminho que escolhi trilhar!

Agradeço a Deus, à toda e qualquer força que ecoe do universo junto Dele, que traçaram para mim um caminho do qual sou e serei eternamente grata. Espero fazer jus ao que me foi proporcionado por toda vida e que eu possa Te orgulhar.

Agradeço à minha primeira “mãe acadêmica”, prof^a Marilda, que ainda hoje me abraça como filha. Você me inspira. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao prof. Flavio, meu orientador durante esse período e, que, de fato, me guiou pacientemente por caminhos que eu desconhecia. Obrigada por abrir as portas, ter me ensinado e orientado. Trabalhar ao seu lado é rapidamente perceber a paixão que tens pelo que faz!

Agradeço também à prof. Andrea Diniz pela coorientação, e por ter somado neste estudo com seu vasto conhecimento e de maneira tão gentil. Estendo o agradecimento aos professores com os quais tive a oportunidade de aprender. Vocês levam à mudança!

Obrigada a todas os meus amigos(as) e colegas pelos momentos de felicidade, fragilidade, trocas e conselhos, ou mesmo aqueles em que só disfrutamos da companhia uns dos outros. Com certeza ter com quem compartilhar tudo, ou nada, faz toda a diferença.

Aos servidores da Universidade Estadual de Maringá, a qual me orgulho em fazer parte, por todo o suporte. Sem vocês não seria possível. Muito obrigada!

Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pelo método HPLC-ESI-MS/MS.

RESUMO GERAL

A cetamina é um fármaco bastante versátil e utilizado em diferentes contextos no ambiente veterinário clínico e hospitalar. A avaliação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais em plasma de gatos domésticos tem importância na correlação do volume de distribuição e visualização dos efeitos esperados com seu uso. O método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-ESI-MS/MS) mostrou-se eficaz para a identificação de fármacos em diversas concentrações e foi utilizada neste estudo associada a ultrafiltração de amostras de plasma reforçado com cetamina. A taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas totais em gatos foi de 65 % quando a concentração plasmática do fármaco atingiu 300 ng/mL. A constante de ligação (K_b) foi de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com um coeficiente de Hill (n_H) positivo de 2,3. Estes resultados apresentam boa correlação com os parâmetros físico-químicos do fármaco e coerência com os valores reportados por outras metodologias.

Palavras-chave: cetamina, analgesia, espectrometria de massas, *Felis catus*.

Determination of ketamine binding rate to total plasma proteins from domestic cats by the HPLC-ESI-MS/MS method.

GENERAL ABSTRACT

Ketamine is a very versatile drug used in different contexts in the clinical and veterinary hospital environment. The evaluation of the binding rate of ketamine to total proteins in plasma from domestic cats is important to correlate the volume of distribution and visualization of the expected effects with its use. The high sensitive analytical method named liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem (HPLC-ESI-MS/MS) proved to be effective for the identification of drugs at a wide range of concentrations and was used in this study associated with ultrafiltration techniques to analyze ketamine-reinforced plasma samples. The binding rate of ketamine to total plasma proteins in cats was 65% after the drug concentration in plasma reached 300 ng/mL. The binding constant (K_b) was $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ with a positive Hill's coefficient (n_H) of 2.3. These results show good correlation with the physicochemical parameters of the drug and coherence with the values reported by other methodologies.

Keywords: ketamine, analgesia, mass spectrometry, *Felix catus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1A:** Teores de cetamina dosados em tampão fosfato e em plasma microfiltrado.....20.
- Figura 1B:** Taxa de ligação da cetamina nas proteínas totais de plasma de gatos domésticos em função da concentração do fármaco (CL).....20.
- Figura 2:** Gráfico de Scatchard para a ligação da cetamina com proteínas totais do plasma de gatos, gerado a partir da dosagem do fármaco por experimentos de HPLC-ESI-MS/MS.....21.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros finais obtidos após a otimização da detecção da cetamina pelo equipamento LC-ESI/MS/MS.....	19.
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL : microlitro

μm : micrômetro

Kg/cm^2 : quilograma força por centímetro cúbico

HPLC-ESI-MS/MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em tandem com fonte de ionização electrospray

LC: Cromatografia líquida

MS: Espectrometria de massas

mm: milímetro

mM: milimolar

MRM: *Multiplex Reaction Monitoring* (monitoramento de reação multiplex)

$^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

K_b : constante de ligação

n_H : coeficiente de Hill

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Material e Métodos.....	16
2.1 Aspectos Éticos.....	16
2.2 Coleta de material biológico.....	16
2.3 Dosagem da cetamina por LC-ESI-MS/MS.....	16
2.3.1. Construção da curva de calibração LC-ESI-MS/MS e otimização dos parâmetros de detecção e ionização.....	16
2.3.2 Processo de preparo das amostras para separação da cetamina do plasma por ultrafiltração.....	17
2.3.3 Dosagem da taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas.....	18
2.3.4 Determinação da constante de ligação.....	18
3. Resultados.....	18
4. Discussão.....	21
5. Conclusões.....	24
7. Referências bibliográficas.....	24

Esta dissertação foi escrita na forma de artigo científico, de acordo com as normas da revista **Research in Veterinary Science** (Elsevier), ISSN: 0034-5288, F.I.: 2.554, Cite Score: 3.9. (<https://www.sciencedirect.com/journal/research-in-veterinary-science>), Qualis Capes A2.



Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pelo método HPLC-ESI-MS/MS.

Victória Paradela Pereira Motta ¹, Fernanda Ferreira da Silva ¹, Marilda Onghero Taffarel ¹, Andrea Diniz ², Flavio Augusto Vicente Seixas ^{3*}.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

³ Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil.

* Autor de correspondência

Av. Ângelo Moreira da Fonseca, 1800, Parque Danielle.
87506-370, Umuarama, PR, Brasil

Phone: +55 44 36219300

e-mail: favseixas@uem.br

Resumo

A cetamina é um fármaco bastante versátil e utilizado em diferentes contextos no ambiente veterinário clínico e hospitalar. A avaliação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais em plasma de gatos domésticos tem importância na correlação do volume de distribuição e visualização dos efeitos esperados com seu uso. O método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-ESI-MS/MS) mostrou-se eficaz para a identificação de fármacos em diversas concentrações e foi utilizada neste estudo associada a ultrafiltração de amostras de plasma reforçado com cetamina. A taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas totais em gatos foi de 65 % quando a concentração plasmática do fármaco atingiu 300 ng/mL. A constante de ligação (K_b) foi de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com um coeficiente de Hill (n_H) positivo de 2,3. Estes resultados apresentam boa correlação com os parâmetros físico-químicos do fármaco e coerência com os valores reportados por outras metodologias.

Palavras-chave: cetamina, analgesia, espectrometria de massas, *Felis catus*.

1. Introdução

A cetamina é um agente anestésico comumente utilizado na rotina médico-veterinária, devido à versatilidade e consequente variedade de aplicabilidade no ambiente clínico (Zeiler et al., 2014). Os principais motivos que estimulam o uso deste fármaco são os efeitos sedativos e anti-nociceptivos importantes que possui, além de sabidamente apresentar propriedades anestésica, analgésica, anti-inflamatória e antidepressiva (Zanos et al., 2018; Sleight et al., 2014).

Os efeitos da cetamina são mediados principalmente pela atuação no antagonismo não competitivo do receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) no sistema nervoso central (Portmann et al., 2010). Possui relativa lipossolubilidade e curto período de latência, por atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica, especialmente quando administrada pela via intravenosa. Após a passagem pelos tecidos mais perfundidos, sofre redistribuição aos tecidos de menor perfusão com consequente redução dos efeitos centrais (Li et al., 2019; Wilson, 2013).

Comercialmente, a cetamina se apresenta como uma mistura racêmica dos enantiômeros R(-) e S(+) para uso clínico (Casoni et al., 2015). É extensamente metabolizada *in vivo* e resulta na formação de seu principal metabólito, a norcetamina, seguida da produção de metabólitos secundários (Zanos et al., 2018). O início deste metabolismo ocorre a partir da desmetilação, sendo as enzimas hepáticas CYP2B6 e CYP3A4 do citocromo P₄₅₀ as principais responsáveis por este processo (Rao et al., 2016).

As enzimas responsáveis pelo metabolismo da cetamina atuam de diferentes maneiras nos dois isômeros, sendo que a CYP2B6 desmetila ambos os enantiômeros de cetamina com eficiência quase igual, e a CYP3A4 que desmetila o enantiômero S(+) mais rapidamente (Portmann et al., 2010). Sendo assim, parte das variabilidades individuais do seu metabolismo são atribuídas às diferenças na expressão das enzimas do citocromo P₄₅₀ pelo organismo do indivíduo (Hijazi e Boulieu, 2002).

Apesar de comumente administrada pela via intramuscular e intravenosa, o uso da cetamina por vias alternativas demonstra ser bastante promissor (Jonkman et al., 2017; Niesters et al., 2014, Kronenberg, 2002). A via intranasal, por exemplo, tem sido

amplamente utilizada na prática médica, especialmente em pacientes pediátricos, e cada vez mais aplicada à rotina Médica Veterinária (Di Salvo et al., 2020). Esta via foi descrita na medicina humana como um método eficaz e seguro para procedimentos que necessitam analgesia e sedação em pacientes pediátricos (Poonai et al., 2017), até mesmo nos setores de emergência hospitalar (Guthrie et al., 2019). Além disso, o uso da cetamina pela via intranasal demonstrou eficácia para o controle da dor crônica e neuropática (Shteamer et al., 2019; Singh et al., 2018; Hugel et al., 2009).

Na medicina veterinária, em estudo realizado por Marjani et al. (2015), o uso de cetamina pela via intranasal em gatos associada ao midazolam foi capaz de promover sedação efetiva nos animais dessa espécie, quando comparada à administração intramuscular, evitando o desconforto causado com o uso desta via, o que reforça a versatilidade e a facilidade da cetamina em se inserir em diferentes contextos.

Fármacos com coeficiente de partição octanol/água positivo, como é o caso da cetamina, tendem a se ligar a proteínas plasmáticas, quanto maior for o valor deste coeficiente. Em pacientes humanos adultos, esta taxa de ligação atingiu cerca de 47 % das proteínas totais (Dayton et al., 1983; Williams et al., 2004). A correta mensuração deste parâmetro é importante pois a porção de fármaco não ligada às proteínas do plasma influencia no volume de distribuição e, conseqüentemente, na visualização precoce dos efeitos sistêmicos (Dinis-Oliveira, 2017).

É sabido que, na maioria dos casos, apenas a porção da droga não ligada às proteínas do plasma é passível de atravessar as membranas celulares por meio de difusão e interagir com o receptor específico para produzir seus efeitos terapêuticos (Smith et al., 2010). Somente após esse processo, o fármaco é passível da metabolização hepática e finalmente excreção renal ou biliar (Rowland e Tozer, 2011). Além disso, a afinidade de um fármaco pelas proteínas plasmáticas tem importância para a concentração esperada do mesmo nos tecidos e no local de ação (Trainor, 2007). Uma vez que somente a porção do fármaco não ligada às proteínas do plasma tem capacidade de atravessar as membranas celulares e exercer seu efeito, a porção que permanece ligada interagindo com sítios específicos das proteínas plasmáticas, não manifesta os resultados esperados no organismo (Yamasaki et al., 2013; Smith et al., 2010). Em vista disso, a porção de fármaco livre tem estreita relação com o volume de distribuição do mesmo pelo organismo, assim como na sua concentração e eliminação, sendo fator importante para o

entendimento do comportamento farmacocinético e farmacodinâmico (Smith et al., 2010).

Nos cães, a afinidade da cetamina pelas proteínas do plasma atingiu cerca de 27% de fármaco ligado especialmente às glicoproteínas plasmáticas (Little et al., 1972; Dayton et al., 1983; Dinis-Oliveira, 2017), o que demonstrou afinidade ainda menor do que a observada no homem. Já em equinos, a taxa foi semelhante à encontrada no homem e apresentou em média 50% de ligação, quando administrada pela via intravenosa (Kaka et al., 1979).

A importância do nível de afinidade de determinado fármaco às proteínas do plasma é reforçada quando há associação de fármacos durante a terapia do paciente (Yamasaki et al., 2013), que é condição comum durante a rotina clínica e hospitalar. O processo de deslocamento competitivo pode ocorrer durante a associação medicamentosa, e resulta em alterações nos graus de afinidade específicos dos fármacos pelo sítio de ligação na proteína (Otagiri, 2005). As alterações dos níveis de afinidade de um fármaco à região específica da proteína, resulta em diferentes concentrações da porção livre no plasma e tem impacto direto na identificação dos seus efeitos sistêmicos (Smith et al., 2010).

É importante ressaltar que a taxa de ligação de um determinado fármaco às proteínas do plasma sofre alterações em estados de doenças metabólicas, como hepatopatias ou nefropatias (Fanali et al., 2012; Otagiri, 2015). As alterações são principalmente oriundas da oscilação na concentração das proteínas que compõem o plasma, decorrentes do desequilíbrio do metabolismo (Taylor et al., 2010). Dessa forma, podem ocorrer alterações da proporção entre o fármaco livre e ligado, e na manifestação dos seus efeitos adversos, o que reforça a importância de conhecer previamente a afinidade entre tal fármaco e as proteínas plasmáticas.

Com base nesse contexto, este estudo teve por objetivo avaliar a taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pelo método de ultrafiltração e mensurado pelo método de cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização electrospray (HPLC-ESI-MS/MS). Os resultados deste trabalho podem contribuir no desenvolvimento de novas vias de administração da cetamina nestes pacientes, haja visto que os valores da

taxa de ligação por esta metodologia, bem como da constante de ligação deste fármaco às proteínas plasmáticas totais ainda não foram reportados na literatura para esta espécie.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos

Este trabalho foi executado após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, protocolo 3292020621.

2.2. Coleta de material biológico

Foi realizada a coleta de amostras de sangue de seis gatos hígidos, sem raça definida, de ambos os gêneros e com idades entre um e cinco anos. As amostras foram coletadas por punção da veia jugular e adicionadas em microtubos previamente heparinizados. O plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 3.500 rpm por 12 minutos em centrífuga clínica de bancada (Metroterm). Ao final, as amostras de plasma foram combinadas em uma única solução de *pool* plasmático com volume aproximado de 35 mL. A concentração de proteínas totais do *pool* de plasma de gatos (em g/dL), foi determinada pelo método de Biureto, utilizando kit da Labtest Diagnóstica® conforme recomendação do fabricante.

2.3. Dosagem da cetamina por LC-ESI-MS/MS

2.3.1. Construção da curva de calibração LC-ESI-MS/MS e otimização dos parâmetros de detecção e ionização

Uma solução de cetamina racêmica R(-) e S(+) (PubChem CID 3821) a 300 ng/mL, dissolvida em metanol (Merck) foi utilizada para otimização dos parâmetros de detecção, de modo automático por um equipamento HPLC com detector de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização electrospray, modelo LCMS-8050 (Shimadzu). Em seguida foi construída uma curva de calibração em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,2, em concentrações variadas entre 40 a 850 ng/mL. Todas as análises foram feitas em coluna C18 Chim-pack XR-ODS III (50 mm × 2 mm, diâmetro interno de 1.6 µm). Os solventes utilizados foram (A) água e (B) metanol, ambos com 0,1% de ácido fórmico. O fluxo do LC foi utilizado no modo isocrático com 85% de metanol a 0,1 mL/min. As análises foram realizadas em triplicatas e os valores das concentrações obtidas em cada ponto corresponderam à média de duas injeções de 10 µL. Os cromatogramas TICs no

modo MRM foram processados pelo programa LabSolutions Insight (Shimadzu) e a área correspondente a cada pico foi utilizada para construção da curva de calibração. O coeficiente de variação foi utilizado para avaliar a qualidade dos pontos da curva. Todos os solventes utilizados no ensaio foram grau LCMS (Merck) e o padrão de cetamina racêmica foi fornecido pela empresa König.

2.3.2. Processo de preparo das amostras para separação da cetamina do plasma por ultrafiltração

Considerando que a dosagem da cetamina no plasma deve ser feita de modo direto, ou seja, sem a necessidade de extração, a dosagem das espécies cetamina total (C_T) e cetamina livre (C_F) foram feitas de duas formas diferentes.

Para a determinação da cetamina total (C_T) foi preparada duas séries de microtubos com concentrações variadas de cetamina. A primeira série se chamava série Plasma, e a segunda se chamava série Tampão fosfato. Na série Plasma, concentrações variadas de cetamina entre 48,8 e 780,5 ng/mL foram adicionadas em 400 μ L de pool plasmático. Na série Tampão fosfato, as mesmas concentrações variadas de cetamina entre 48,8 e 780,5 ng/mL foram adicionadas em 400 μ L de tampão fosfato 20 mM pH 7,2.

Em seguida, todos os microtubos de ambas as séries foram incubados em banho-Maria 30 °C por 20 minutos e, em seguida transferidos para concentrador Amicon Ultra® de 0,5 mL, com *cutoff* de 10 kDa e membrana filtrante de celulose regenerada. A amostra foi centrifugada em temperatura de 30 °C por 2 horas a 3.500 *g*. Após esse período, o volume do filtrado (~100 μ L), foi transferido para *inserts* em *vials* de LCMS para realizar a dosagem das concentrações de cetamina correspondentes.

A série Tampão fosfato foi construída por dois motivos. Primeiro, para dosar a cetamina total (C_T) que teria sido adicionada à série Plasma (filtrante), sem a necessidade de extração. Segundo, como não havia proteínas plasmáticas nos tubos da série Tampão fosfato, a concentração de cetamina do filtrante deveria ser igual ao filtrado, e com este procedimento, verificar se a membrana do concentrador poderia, de alguma forma, reter a cetamina e interferir com o resultado. Assim, as concentrações cetamina adicionadas ao Tampão fosfato são iguais as concentrações de cetamina adicionadas ao plasma e compõem a fração C_T .

Já a série Plasma foi utilizada para obter a cetamina livre que não se ligou ao plasma (C_F) após a ultrafiltração. Assim, a diferença entre a concentração de cetamina livre dosada no plasma microfiltrado (C_F) e a concentração de cetamina total dosada na série Tampão fosfato (C_T), fornece a concentração de cetamina que se ligou às proteínas do plasma (C_L).

2.3.3. Dosagem da taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas

As áreas dos cromatogramas TICs gerados após a passagem das amostras pelo LC-ESI-MS/MS foram utilizadas para determinação das concentrações de cetamina ao aplicar a equação da reta construída com a curva de calibração. Os valores de concentrações obtidos foram utilizados para calcular a taxa de ligação da cetamina (TL) às proteínas plasmáticas conforme Equação 1.

$$TL(\%) = \frac{C_T - C_F}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

Onde C_T é a concentração total da cetamina adicionada ao plasma e C_F é a concentração da cetamina livre no plasma após a microfiltração.

2.3.4. Determinação da constante de ligação

Os valores de C_F foram utilizados para calcular a constante de ligação (K_b) por meio do método de Scatchard (Tinoco et al, 1995), onde a equação de Hill (Equação 2) foi ajustada aos pontos experimentais (Bordbar et al., 1996).

$$v = g \frac{(K_b[C_F])^{n_H}}{1 + (K_b[C_F])^{n_H}} \quad (2)$$

onde v é a fração de fármacos ligados por macromolécula, g é um fator de amplitude máxima da curva de ligação, $[C_F]$ é a concentração do fármaco livre, K_b é a constante de ligação, e n_H é o coeficiente de Hill (cooperatividade).

3. Resultados

Os parâmetros finais após otimização para ionização e detecção da cetamina por HPLC-ESI-MS/MS são mostrados na Tabela 1. Este procedimento é importante

para que as concentrações mais baixas do fármaco possam ser detectadas acima do limite de detecção (ruído) inerente ao ensaio.

Tabela 01. Parâmetros finais obtidos após a otimização da detecção da cetamina pelo equipamento LC-ESI/MS/MS.

Parâmetro	Valores
Fluxo LC	0.1 mL/min
Concentração solvente B (metanol)	85 %
Temperatura do forno de coluna	40 °C
Volume de injeção de amostra	10 µL
Gás de nebulização	3 L/min
Gás de secagem	10 L/min
Gás de aquecimento	10 L/min
Gás de colisão (CID) argônio	270 kPa
Temperatura da interface ESI	200 °C
Temperatura de dessolvatação	526 °C
Temperatura da DL	250 °C
Temperatura do Heat Block	400 °C
Razão <i>m/z</i> íon precursor	238.1
Razão <i>m/z</i> íons produtos	125.05, 132.10, 209.95
<i>Event time</i>	0,309 s
<i>Dwel time</i>	100 mili s

A presença de solventes polares como a água pode dificultar a ionização da substância de interesse. Assim, é importante fazer a otimização do fármaco dissolvido em metanol puro e, durante a análise por LC, manter uma concentração alta deste solvente na fase móvel, mas ainda manter uma porcentagem de água que garanta a solubilização e separação de outros componentes do plasma durante a passagem pela coluna.

Após os procedimentos de otimização dos métodos LC e MS, procedeu-se com a construção da curva de calibração para dosagem da cetamina, cujos resultados são apresentados na Figura S1 (material suplementar), onde o coeficiente de variação médio ficou abaixo de 9,0 % (Tabela S1, material suplementar). A curva de calibração foi construída em tampão fosfato pH 7,2 para que se aproximasse ao máximo possível das condições do plasma periférico, mas sem ser concentrado em sais a ponto de prejudicar a ionização da cetamina, nem causar danos a interface de ionização.

De posse da curva de calibração, procedemos com a dosagem da cetamina nas amostras adicionadas do fármaco, cujos resultados são mostrados na Figura 1A.

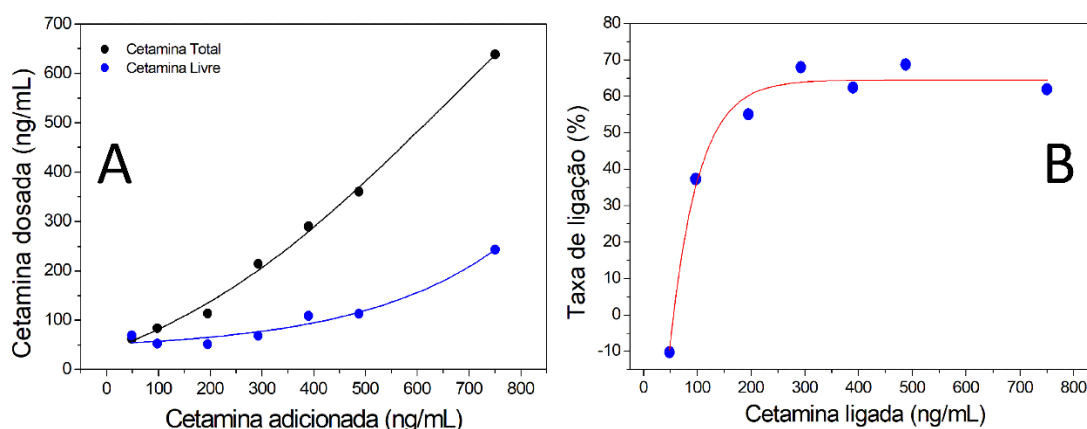


Figura 1. (A) Teores de Cetamina dosados em tampão fosfato (filtrante, representando a C_T , círculos pretos) e em plasma microfiltrado (filtrado, representando a C_F , círculos azuis). **(B)** Taxa de ligação da cetamina nas proteínas totais de plasma de gatos domésticos em função da concentração do fármaco (C_L), conforme Equação 1. O tamanho dos círculos tem a dimensão do desvio padrão.

A concentração da C_T mostrada na Figura 1A, foi obtida por meio da adição deste fármaco no tampão fosfato, o qual depois foi ultrafiltrado em centrador Amicon, e dosado tanto no filtrante, quanto no filtrado desta série. Como não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a concentração de C_T no filtrante e no filtrado, concluímos que a cetamina não se ligou à membrana de celulose regenerada do concentrador quando avaliada em tampão fosfato. Isso forneceu segurança para a quantificação da C_F na série plasma microfiltrado pois, a diferença entre a C_T (adicionada ao plasma) e a C_F (dosada no plasma microfiltrado) pode ser atribuída inteiramente à cetamina ligada (C_L).

Assim, a aplicação da Equação 1 aos valores de concentração de cetamina correspondentes, resultou numa taxa de ligação de cerca de 65 % do fármaco às proteínas do plasma de gatos, quanto atingido o pico plasmático acima de 300 ng/mL, conforme exposto na Figura 1B.

Para a determinar a constante de ligação da cetamina às proteínas totais (K_b), foi necessário dosar a concentração destas proteínas totais no *pool* de plasma, o qual foi feito com kit de diagnóstico clínico pelo método de Biureto. Como resultado, a concentração de proteínas totais no *pool* de plasma utilizado neste ensaio, sem a adição de fármacos (plasma puro), foi 8 g/dL ($8,36 \times 10^4$ mg/L), valor que está dentro do valor de referência para este marcador, o qual varia entre 6,0 a 8,0 g/dL (Weiss e Wardrop, 2010).

O cálculo da constante de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas foi realizado por meio do gráfico de Scatchard. Para isso, levou-se em consideração o peso molecular da albumina de soro de gato (*Felix catus*) conforme registro na base de dados Uniprot (identificador P49064), cujo peso molecular é de 65.845,05 Da. Em seguida foi feito o ajuste da Equação 2 aos pontos experimentais para se obter os parâmetros K_b e n_H , conforme mostrado na Figura 2.

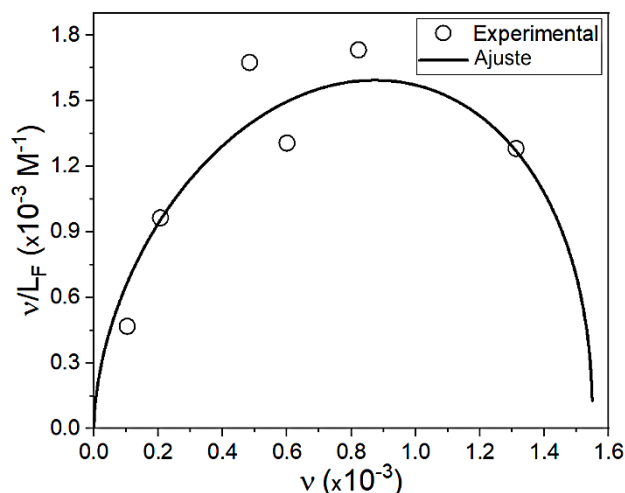


Figura 2. Gráfico de Scatchard para a ligação da cetamina com proteínas totais do plasma de gatos, gerado a partir da dosagem do fármaco por experimentos de ultrafiltração e dosados por HPLC-ESI-MS/MS. A linha sólida mostra o ajuste aos pontos experimentais por meio da Equação 2, com um coeficiente de correlação (R) entre eles de 0,94.

O ajuste da Equação 2 aos pontos experimentais da Figura 2, forneceu uma constante de ligação K_b de $2 \times 10^6 M^{-1}$ com um coeficiente de Hill (n_H) de 2,3.

4. Discussão

Do ponto de vista farmacológico, é muito mais interessante determinar a taxa de ligação de um fármaco às proteínas plasmáticas totais do que à albumina isoladamente, pois a ligação às proteínas totais pode fornecer uma visão mais realística da biodisponibilidade, enquanto que a taxa de ligação de um fármaco à albumina gera informações mais voltadas ao ponto de vista termodinâmico e biofísico.

A taxa de ligação da cetamina às proteínas totais de plasma de gatos já foi reportada por Hijazi et al, (2002b) pelo método de ultrafiltração associado a

espectrometria gasosa, tanto na forma isolada (66% de ligação), como na presença de metabólitos (com 60% de ligação), ambos a 30 °C. Este valor está de acordo com a taxa encontrada neste trabalho para a cetamina isolada (65%). O diferencial de nosso trabalho é que utilizamos uma metodologia muito mais sensível e também determinamos a constante de ligação (K_b), e demonstramos uma cooperatividade positiva na ligação da cetamina ($n_H=2,3$).

Comparativamente, os valores reportados na literatura para a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas entre outras espécies como a equina e a humana foram semelhantes entre si, atingindo acerca de 50 % do percentual de ligação em ambas as espécies (Kaka et al., 1979; Dayton et al., 1983; Williams et al., 2004). Em cães, a taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma foi de 53,1 %, mensurada pelo método de diálise de equilíbrio (Kaka et al., 1979). Em outro ensaio com a espécie canina, foram encontrados valores menores de taxa de ligação às proteínas totais pelo mesmo método (33%), porém, com o pH apresentando valores médios de 7,36 (Dayton et al., 1983).

Contudo, já é sabido que a taxa de ligação de um fármaco às proteínas do plasma é influenciada pelo pH do meio (Dayton et al., 1983; Kragh-Hansen, 1990). Um valor de pH abaixo do que é considerado fisiológico para a espécie, tende a diminuir a afinidade do fármaco às proteínas plasmáticas e, conseqüentemente, no volume de distribuição da droga pelo organismo (Hinderling e Hartmann, 2005). Essa condição torna o pH um parâmetro de interesse para a correlação do percentual de ligação de afinidade da droga pelas proteínas do plasma.

A taxa de ligação de um fármaco às proteínas plasmáticas totais também sofre influência da concentração de albumina no plasma, a qual pode ser notada ao comparar a afinidade de um fármaco no plasma e no soro humano, o qual é rico em albumina, e resulta em taxas de ligação semelhantes (Colclough et al., 2014; Yang et al., 2014). A concentração de albumina plasmática pode ser alterada em quadros de doenças metabólicas como hepatopatias, nefropatias e injúrias como queimaduras, que são quadros clínicos responsáveis por alterar as concentrações dessa proteína no plasma (Fanali et al., 2012; Otagiri, 2005).

É sabido que compostos mais hidrofóbicos tendem a se ligar muito mais facilmente às proteínas plasmáticas do que substâncias hidrofílicas (Arnott e Planey,

2012). A solubilidade de um composto pode ser determinada pelo coeficiente de partição octanol/água (*XlogP3*) onde, compostos mais hidrofóbicos tendem a ter valores mais positivos enquanto que compostos mais hidrofílicos tendem a ter valores mais negativos. Assim, comparativamente, um fármaco significativamente lipossolúvel como o propofol (PubChem CID 4943) possui *XlogP3* de 3,8 e uma taxa de ligação de 88,7% em humanos, enquanto que um fármaco muito menos lipossolúvel como a morfina (PubChem CID 5288826), possui *XlogP3* de 0,8 com taxa de ligação às proteínas plasmáticas totais de 31,6 % em equinos (Roberts et al., 2013; Altmayer et al., 1995; Combie et al., 1983). A cetamina possui o *XlogP3* de 2,2 (PubChem CID 3821), assim, o grau de solubilidade deste fármaco apresentou coerência com a taxa de ligação às proteínas plasmáticas mensuradas em plasma de gatos neste trabalho (65 %).

A constante de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas foi descrita neste trabalho como sendo de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Comparativamente, outros ligantes apresentaram constantes de ligação com a albumina com valores próximos. Os flavonóides, por exemplo, apresentam constantes de ligação variando entre $1\text{--}15 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Dufour et al, 2005), o fármaco refecoxib (Pubchem CID 5090) apresenta K_b de $3.450 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 31 °C (Qi, et al, 2008) com *XlogP3* de 2,3. Mas de modo geral, as constantes de ligação de pequenas moléculas à albumina variam ente $10^3\text{--}10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kragh-Hansen, 1990).

A albumina corresponde à maior parte das proteínas plasmáticas totais e encontra-se em concentrações que atingem cerca de 46,7 g/L nos gatos (Taylor et al., 2010; Moore e Avery, 2018). Da mesma forma ocorre no plasma humano, que possui a albumina como principal componente proteico plasmático, porém, com maiores variações nas concentrações, em cerca de 26,5 a 46,5 g/L (Schaller et al., 2008). Por estar numa faixa de concentração mais estreita, a concentração da albumina é mais constante em gatos saudáveis, o que ajuda a explicar os valores de taxas de ligação e de constante de ligação bem semelhantes aos nossos, reportados na literatura e citados no início desta discussão.

O coeficiente de Hill positivo está relacionado com a cooperatividade positiva no processo de ligação de um ligante a uma proteína. Isso significa que a ligação da primeira molécula de cetamina em um sítio de uma proteína, facilita a ligação nos demais sítios (Tinoco et al., 1995). Assumimos que a cooperatividade se deve à ligação da cetamina à albumina, pois esta é a proteína majoritária do plasma e que também é capaz de ligar mais de um fármaco ao mesmo tempo, por sabidamente possuir mais de um sítio de ligação

(Carter et al, 1994). A descrição da cooperatividade positiva na ligação da cetamina à albumina é descrita pela primeira vez neste trabalho.

5. Conclusões

A taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas totais em gatos domésticos foi mensurada em 65% a partir de concentrações plasmáticas superiores a 300 ng/mL, com uma constante de ligação (K_b) de $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e n_H de 2,3. Tanto a taxa quanto a constante de ligação da cetamina a proteínas plasmáticas totais estão de acordo com o reportado na literatura para esta espécie por meio de metodologias similares.

Agradecimentos

Os autores agradecem a empresa König do Brasil Ltda. pelo fornecimento dos padrões; à CAPES (código 001), CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro e COMCAP/UEM.

6. Referências Bibliográficas

- Altmayer P., Büch U, Büch H.P. 1995. Propofol binding to human blood proteins. *Clinic of Anesthesiology and Intensive Care Medicine* 45, 1053-1056.
- Arnott, J.A., Planey, S.L. 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Informa UK*, 909-921.
- Baggot, J.D., Blake, J.W. 1976. Disposition kinetics of ketamine in the domestic cat. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 220, 115-124.
- Bordbar, A.K.; Saboury, A.A.; Moosavi-Movahedi, A.A. The shapes of Scatchard plots for systems with two sets of binding sites, *Biochemical Education*, v. 24, p. 172-175, 1996.
- Carter, D.C. & Ho, J.X. (1994) Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153–203.
- Casoni, D.; Spadavecchia, C.; Adami, C. 2015. S-ketamine versus racemic ketamine in dogs: their relative potency as induction agents. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42, 250–259.
- Colclough, N., Ruston, L., Wood, M.J., MacFaul, P.A. 2014. Species differences in drug plasma protein binding. *The Royal Society of Chemistry* 5, 963-967.
- Combie J.D., Nugent T.E., Tobin T. 1983. Pharmacokinetics and protein binding of morphine in horses. *American Journal of Veterinary Research* 44, 870-874.

- Dayton, P.G., Stiller, R.L., Cook, D.R., Perel, J.M. 1983. The Binding of Ketamine to Plasma Proteins: Emphasis on Human Plasma. *European Journal of Clinical Pharmacology* 24, 825-831.
- Dinis-Oliveira, R.J. 2017. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. *Forensic Sciences Research* 2, p.2-10.
- Dufour, C., & Dangles, O. (2005). Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 1721(1-3), 164-173.
- Fanali, G., Mais, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M.M., Ascenzi, P. 2012. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33, 209-290.
- Guthrie, A.M., Baum, R.A., Carter, C., Dugan, A., Jones, L., Tackett, T., Bailey, A.M. 2019. Use of Intranasal Ketamine in Pediatric Patients in the Emergency Department. *Pediatric Emergency Care* 0.
- Hijazi, Y., Boulieu, R. 2002a. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Isoforms to N-Demethylation of Ketamine in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 853–858.
- Hijazi, Y., & Boulieu, R. (2002b). Protein binding of ketamine and its active metabolites to human serum. *European journal of clinical pharmacology*, 58(1), 37-40.
- Hinderling, P.H., Hartmann, D. 2005. The pH Dependency of the Binding of Drugs to Plasma Proteins in Man. *Therapeutic Drug Monitoring* 27, 71-85.
- Huge, V., Lauchart, M., Magerl, W., Schelling, G., Beyer, A., Thieme, D., Azad, S.C. 2010. Effects of low-dose intranasal (S)-ketamine in patients with neuropathic pain. *European Journal of Pain* 14, 387–394.
- Jonkman, K., Duma, A., Velzen, M., Dahan, A. 2017. Ketamine inhalation. *British Journal of Anaesthesia* 118, 268–269.
- Kaka, J.S., Klavano, P.A., Hayton, W.L. 1979. Pharmacokinetics of ketamine in the horse. *American Journal of Veterinary Research* 40, 978-981.
- Kragh-Hansen, U. (1990). Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish medical bulletin*, 37(1), 57-84.
- Kronenberg, R.H. 2002. Ketamine as an Analgesic: Parenteral, Oral, Rectal, Subcutaneous, Transdermal and Intranasal Administration. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 16, 27-35.
- Li, R., Zhong, K., Jiang, J., Zhan, Y., Chen, X. 2019. Enantioselective determination of ketamine in dog plasma by chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*.
- Little, B., Chang, T., Chucot, L., Dill, W.A., Enrile, L.I., Glazko, A.J., Jassani, M., Kretchmer, H.; Sweet, A.Y. 1972. Study of ketamine as an obstetric anesthetic agent. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 23-25.
- Marjani, M., Vahid Akbarinejad, V., Bagheri, M. 2015. Comparison of intranasal and intramuscular ketamine midazolam combination in cats. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 42, 178–181.

Moore, A.R., Avery, P.R. 2018. Protein characterization using electrophoresis and immunofixation; a case-based review of dogs and cats. *American Society for Veterinary Clinical Pathology* 00, 1-16.

National Library of Medicine. PubChem, 2021. Disponível: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Niesters, M., Martini, C., Dahan, A. 2014. Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *British Journal of Clinical Pharmacology* 77, 357-367.

Otagiri, M. 2005. A Molecular Functional Study on the Interactions of Drugs with Plasma Proteins. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 20, 309-323.

Poonai, N., Canton, K., Ali, S., Hendrikx, S., Shah, A., Miller, M., Joubert, G., Rieder, M., Hartling, L., Ma, Z.L. 2017. Intranasal ketamine for procedural sedation and analgesia in children: A systematic review. *Plos One* 12.

Portmann, S., Kwan, H.Y., Theurillat, R., Schmitz, A., Mevissen, M., Thormann, W. 2010. Enantioselective capillary electrophoresis for identification and characterization of human cytochrome P450 enzymes which metabolize ketamine and norketamine in vitro. *Journal of Chromatography A* 1217, 7942–7948.

Qi, Z. D., Zhou, B., Qi, X., Chuan, S., Liu, Y., & Dai, J. (2008). Interaction of rofecoxib with human serum albumin: determination of binding constants and the binding site by spectroscopic methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 193(2-3), 81-88.

Rao, L.K., Flaker, A.M., Friedel, C.C., Kharasch, E.D. 2016. Role of Cytochrome P4502B6 Polymorphisms in Ketamine Metabolism and Clearance. *Anesthesiology* 125, 1103–1112.

Roberts, J.A., Pea, F., Lipman, J. 2013. The Clinical Relevance of Plasma Protein Binding Changes. *Clinical Pharmacokinetics* 52, 1-8.

Schaller, J., Gerber, S., Kämpfer, U., Lejon, S., Trachsel, C. 2008. *Human Blood Plasma Proteins*, John Wiley & Sons, England.

Singh, V., Gillespie, T.W., Harvey, R.D. 2018. Intranasal Ketamine and Its Potential Role in Cancer-Related Pain. *Pharmacotherapy* 38, 390-401.

Sleigh, J., Harvey, M., Voss, L., Denny, B. 2014. Ketamine – More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 4, 76-81.

Smith, D.A., Di, L.; Kerns, E.H. 2010. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nature* 9.

Steamer, J.W., Harvey, R.D.; Spektor, B., Curseen, K., Egan, K., Chen, Z., Gillespie, T.W., Sniecinski, R.M., Singh, V. 2019. Safety of Intranasal Ketamine for Reducing Uncontrolled Cancer-Related Pain: Protocol of a Phase I/II Clinical Trial. *JMIR Reasearch Protocols* 8.

Taylor, S.S., Tappin, S.W., Dodkin, S., Papasouliotis, K., Casamian-Sorrosal, D., Tasker, S. 2010. Serum protein electrophoresis in 155 cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12, 643-653.

Tinoco Jr, I., Sauer, K., Wang, J.C. 1995. Physical Chemistry: Principles and applications in biological sciences. 3rd edition, Prentice Hall, New Jersey, 761 p.

Trainor, G.L. 2007. The importance of plasma protein binding in drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2, 51-64.

Weiss, D.J., Wardrop, K.J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology, sexta ed. Willey-Blackwell.

Williams, M.L., Mager, D.E., Parenteau, H., Gudi, G., Tracy, T.S., Mulheran, M., Wainer, W.I. 2004. Effects of Protein Calorie Malnutrition on the Pharmacokinetics of Ketamine in Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 32.

Wilson, G.S. 2013. Ketamine: old dogs, new tricks. *South African Journal of Anaesthesia and Analgesia* 19, 24-26.

Yamasaki, K., Chuang, V.T.G., Maruyama, T., Otagiri, M. 2013. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 5435-5443.

Yang, F., Zhang, Y., Liang, H. 2014. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *Internacional Journal of Molecular Sciences* 15, 3580-3595

Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Riggs, L.M., Highland, J.N., Georgiou, P., Pereira, E.F.R., Albuquerque, E.X., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Gould, T.D., Witkin, J.M. 2018. Ketamine and Ketamine Metabolite Pharmacology: Insights into Therapeutic Mechanisms. *Pharmacological Reviews* 70, 621–660.

Zeiler, G.E., Brighton, T.D., Fosgate, G.T., Stegmann, F.G., Venter, F.J., Rioja, E. 2014. Anaesthetic, analgesic and cardiorespiratory effects of intramuscular medetomidine-ketamine combination alone or with morphine or tramadol for orchiectomy in cats. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 41, 411-420.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pelo método HPLC-ESI-MS/MS.

Victória Paradela Pereira Motta ¹, Fernanda Ferreira da Silva ¹, Marilda Onghero Taffarel ¹, Andrea Diniz ², Flavio Augusto Vicente Seixas ^{3*}.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

³ Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil.

* Autor de correspondência

Av. Ângelo Moreira da Fonseca, 1800, Parque Danielle.

87506-370, Umuarama, PR, Brasil

Phone: +55 44 36219300

e-mail: favseixas@uem.br

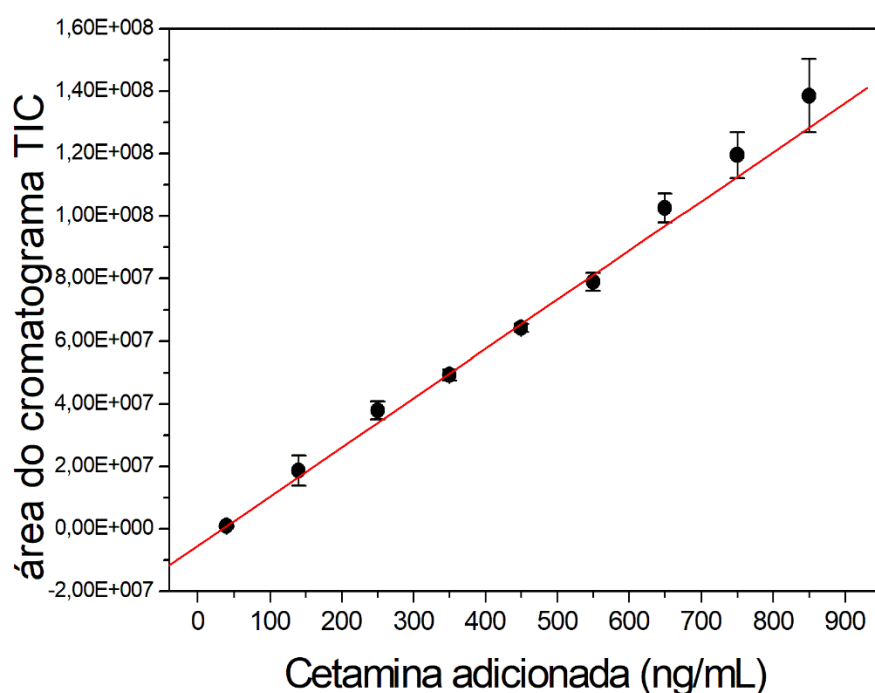


Figura S1. Curva de calibração para dosagem da cetamina em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,2. Cada ponto representa a média de três repetições com duas injeções cada (seis cromatogramas). Parâmetros da curva: $y = a + bx$, $a = -537.382,00 \pm 186.285,35$; $b = 157.273,32 \pm 2290,73$; $R=0,99926$.

Tabela S1. Coeficientes de variação obtidos para cada ponto de concentração utilizado na construção da curva de calibração da cetamina.

Concentração (ng/mL)	Área média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
40	0,91E+07	1,52E+06	16,68
140	1,87E+07	4,78E+06	25,62
250	3,79E+07	2,85E+06	7,51
350	4,93E+07	1,81E+06	3,67
450	6,42E+07	1,38E+06	2,15
550	7,89E+07	2,94E+06	3,72
650	1,03E+08	4,64E+06	4,53
750	1,19E+08	7,39E+06	6,19
850	1,39E+08	1,17E+07	8,47
Média:			8,73