

Universidade Estadual de Maringá – Campus Umuarama
Departamento de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal

SAMARA BOSSA ALEIXO

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LIGAÇÃO DA CETAMINA ÀS PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS TOTAIS DE CÃES POR ULTRAFILTRAÇÃO E HPLC-ESI-MS/MS

Umuarama, fevereiro de 2024

SAMARA BOSSA ALEIXO

Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas totais de cães por ultrafiltração e 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 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

Umuarama, fevereiro de 2024

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

TERMO DE APROVAÇÃO

SAMARA BOSSA ALEIXO

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

Prof. Dr. Otávio Akira Sakai

Membro: Instituto Federal do Paraná

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe e à minha irmã, todo o apoio e suporte durante a minha trajetória. Obrigada por sempre me incentivarem e acreditarem que eu seria capaz de superar os obstáculos que surgiram. Vocês foram essenciais.

Ao meu parceiro de vida, Valber, minha gratidão por ser meu ponto de equilíbrio e apoio emocional neste período, obrigada por estar sempre ao meu lado e ser meu lugar de paz.

Agradeço aos colegas de profissão, especialmente à Gabriela, minha parceira de pós-graduação e à Victória, toda ajuda, companhia, conselhos e ensinamentos. Com vocês a caminhada se tornou mais leve e agradável.

Ao meu orientador, professor Flavio, sou grata por ter me acolhido desde a graduação e proporcionado tamanho conhecimento e oportunidades nesse período. Obrigada pela disponibilidade e pela paciência para ensinar, por estar sempre de prontidão para me auxiliar e por confiar em mim para realização deste trabalho.

À professora Marilda, que gentilmente me acolheu e desempenhou um papel fundamental na minha trajetória acadêmica, obrigada pelo amparo e direcionamento nos momentos de incerteza. Você é inspiração para mim.

E por fim, minha gratidão à Universidade Estadual de Maringá e seus professores, pelo elevado nível de ensino oferecido, proporcionando uma formação íntegra e digna.

RESUMO

A cetamina é um fármaco muito utilizado na Medicina Veterinária para indução e manutenção anestésica, além de promover analgesia. É classificado como um anestésico dissociativo, por exercer seu mecanismo de ação principalmente por bloqueio não competitivo do receptor ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA). A taxa de ligação dos fármacos às proteínas do plasma desempenha um papel importante na disponibilidade de uma droga no organismo, sendo a albumina e alfa-1-glicoproteína ácida as principais proteínas responsáveis por se ligarem aos fármacos. O objetivo desse trabalho foi determinar a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas de cães. As amostras de sangue foram coletadas de quatro cães hígidos e posteriormente centrifugadas para obtenção do plasma. O pH do *pool* plasmático foi de 7,25 e a concentração de proteínas totais e de albumina, medidos pelo método de Biureto, foram de 51,6 mg/mL e 32,0 mg/mL, respectivamente. A técnica de ultrafiltração associada a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (HPLC-ESI-MS/MS) foi utilizada neste estudo para avaliar taxa de ligação de cetamina às proteínas plasmáticas totais de cães. Os resultados mostraram que o valor da taxa de ligação da cetamina foi de 84% quando a concentração plasmática do fármaco atingiu 300 ng/mL. A constante de ligação (K_b) foi de $3,76 \times 10^6$ mol/L com um coeficiente de Hill (n_H) positivo de 2,8. Os dados encontrados neste trabalho podem contribuir em futuros estudos farmacocinéticos da cetamina em cães.

Palavras-chave: anestésico geral, farmacologia, *Canis lupus familiaris*.

ABSTRACT

Ketamine is a drug widely used in Veterinary Medicine for induction and maintenance of anesthetic, in addition to promoting analgesia. It is classified as a dissociative anesthetic, as its mechanism of action is mainly through non-competitive blockade of the ionotropic N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor. The rate of drug binding to plasma proteins plays an important role in the availability of a drug in the body, with albumin and alpha-1-acid glycoprotein being the main proteins responsible for binding to drugs. The objective of this work was to determine the binding rate of ketamine to plasma proteins in dogs. Blood samples were collected from four healthy dogs and subsequently centrifuged to obtain plasma. The pH of the plasma pool was 7.25 and the concentration of total proteins and albumin, measured by the Biuret method, were 51.6 mg/mL and 32.0 mg/mL, respectively. The ultrafiltration technique associated with liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS) was used in this study to evaluate the binding rate of ketamine to total plasma proteins in dogs. The results showed that the binding rate value of ketamine was 84% when the plasma concentration of the drug reached 300 ng/mL. The binding constant (K_b) was 3.76×10^6 mol/L with a positive Hill coefficient (nH) of 2.8. The data found in this work may contribute to future pharmacokinetic studies of ketamine in dogs.

Key-words: general anesthetic, pharmacology, *Canis lupus familiaris*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - 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).	18
Figura 2 - Teores de cetamina dosados em tampão fosfato (filtrante, círculos pretos) e em plasma microfiltrado (triângulos vermelhos).	19
Figura 3 - Taxa de ligação da cetamina às proteínas totais de plasma de cães em função da concentração do fármaco, de acordo com a Equação 1. O tamanho dos círculos tem a dimensão do desvio padrão.	20
Figura 4 - Gráfico de Scatchard para a ligação da cetamina com proteínas totais do plasma de cães. A linha sólida mostra o ajuste aos pontos experimentais por meio da Equação 2.	21
Figura 5 - Frações esperadas das diferentes formas ionizadas da cetamina em função do pH. A linha em laranja representa a fração da forma desprotonada (sem carga, menos solúvel) da cetamina, em função do pH.	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO GERAL	12
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Coleta de material biológico.....	13
4.2. Dosagem da cetamina pelo método LC-ESI-MS/MS.....	13
4.2.1. Preparo das amostras para ultrafiltração da cetamina no plasma	13
4.2.2. Construção da curva de calibração LC-ESI-MS/MS e otimização dos parâmetros de detecção e ionização	14
4.2.3. Dosagem da taxa de ligação da cetamina as proteínas plasmáticas	15
4.2.4. Determinação da constante de ligação	15
4.2.5. Análises dos dados.....	16
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

A cetamina é um fármaco muito utilizado na Medicina Veterinária para indução e manutenção anestésica, além de promover analgesia. É classificado como um anestésico dissociativo, por exercer seu mecanismo de ação principalmente por bloqueio não competitivo do receptor ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA). A taxa de ligação dos fármacos às proteínas do plasma desempenha um papel importante na disponibilidade de uma droga no organismo, sendo a albumina e alfa-1-glicoproteína ácida as principais proteínas responsáveis por se ligarem aos fármacos. O objetivo desse trabalho foi determinar a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas de cães. As amostras de sangue foram coletadas de quatro cães hígidos e posteriormente centrifugadas para obtenção do plasma. O pH do *pool* plasmático foi de 7,25 e a concentração de proteínas totais e de albumina, medidos pelo método de Biureto, foram de 51,6 mg/mL e 32,0 mg/mL, respectivamente. A técnica de ultrafiltração associada a cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (HPLC-ESI-MS/MS) foi utilizada neste estudo para avaliar taxa de ligação de cetamina às proteínas plasmáticas totais de cães. Os resultados mostraram que o valor da taxa de ligação da cetamina foi de 84% quando a concentração plasmática do fármaco atingiu 300 ng/mL. A constante de ligação (K_b) foi de $3,76 \times 10^6$ mol/L com um coeficiente de Hill (n_H) positivo de 2,78. Os dados encontrados neste trabalho podem contribuir em futuros estudos farmacocinéticos da cetamina em cães.

Palavras-chave: anestésico geral, farmacologia, *Canis lupus familiaris*.

1. INTRODUÇÃO

A cetamina é um fármaco amplamente empregado na Medicina Veterinária, sendo utilizada para indução e manutenção anestésica, além de promover analgesia (WAGNER et al., 2002). É classificado como um anestésico dissociativo, por exercer seu mecanismo de ação principalmente por bloqueio não competitivo do receptor ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA), impedindo o influxo de íons cálcio através deste canal no sistema nervoso central, mecanismo responsável pelas propriedades anestésicas do fármaco, tal como produzir amnésia, analgesia, neuroproteção e efeitos psicossensoriais. (MION; VILLEVIEILLE, 2013).

Além de atuar em receptores NMDA, a cetamina interage com outros alvos farmacológicos, dentre eles os receptores opioides, colinérgicos, dopaminérgicos, serotoninérgicos e receptores sigma (KOHTALA, 2021). Além dos efeitos supracitados, midríase, nistagmo, hipersalivação e lacrimejamento são comumente observados (PAI; HEINING, 2007). Devido à sua ação simpatomimética, a estabilidade cardiovascular e respiratória é mantida durante a anestesia (KOHTALA, 2021).

A cetamina comercializada é composta por uma mistura racêmica dos enantiômeros R (-) e S (+). O enantiômero S (+) promove maior efeito analgésico e sua metabolização ocorre mais rapidamente, quando comparada à mistura racêmica de cetamina (MIHALJEVIĆ et al., 2020). As vias intravenosa e intramuscular são as principais rotas de administração, mas são descritas vias alternativas como intranasal, retal, subcutânea e intratecal (DINIS-OLIVEIRA, 2017). Em termos de propriedades físico-químicas, é tida como uma base fraca, com pK_a de 7,5. É um fármaco lipossolúvel e com extenso volume de distribuição para os tecidos, o qual rapidamente atravessa a barreira hematoencefálica. Possui ampla metabolização hepática pelas enzimas do citocromo P₄₅₀, por N-desmetilação, sendo a norcetamina o metabólito principal, que posteriormente sofrerá excreção renal (WILSON, 2013).

Dentre os parâmetros farmacocinéticos, a taxa de ligação dos fármacos às proteínas do plasma desempenha um papel importante na disponibilidade de uma droga no organismo (SCHMIDT; HOLZGRABE, 2024). Uma vez na circulação sanguínea, os fármacos ligam-se às proteínas plasmáticas em diferentes graus, de forma reversível, e mantém-se um equilíbrio dinâmico entre a fração ligada e a fração livre (OTAGIRI, 2009).

A albumina e alfa-1-glicoproteína ácida são as principais proteínas responsáveis por se ligarem aos fármacos, sendo a primeira a mais abundante do plasma (TRAINOR, 2007). Partindo do princípio de que apenas a fração livre do fármaco é capaz de interagir com o alvo

molecular, o estudo da taxa de ligação de fármacos às proteínas plasmáticas é um parâmetro importante na farmacologia (HOWARD et al., 2010).

A fração da droga ligada às proteínas possui uma significativa influência na taxa de difusão do fármaco entre o plasma e os tecidos, podendo interferir no volume de distribuição e na depuração do fármaco (BOHNERT; GAN, 2013). Os complexos fármaco-proteína no plasma também atuam como um reservatório para a concentração do fármaco livre, pois somente a fração livre é passível de sofrer os processos de metabolização e eliminação no organismo (KRATOCHWIL et al., 2002).

A relevância do nível de ligação às proteínas também é evidenciada quando há a administração simultânea de fármacos, pois a interação medicamentosa e o deslocamento competitivo (em que ambos os ligantes possuem o mesmo sítio de ligação na proteína) poderá resultar no aumento da fração livre e, conseqüentemente, os efeitos terapêuticos serem alterados (TOMA et al., 2021). Outro aspecto importante a ser levado em consideração, diz respeito a pacientes que apresentam redução dos níveis de albumina devido à alguma disfunção orgânica, uma vez que a redução de sítios disponíveis para os ligantes levará a maior quantidade de moléculas livres (TAYYAB; FERROZ, 2021).

A diálise de equilíbrio e a ultrafiltração são os métodos mais frequentes usados para mensuração do nível de ligação dos fármacos às proteínas (DIMITRIJEVIC et al., 2023). Em seres humanos, por meio de diálise de equilíbrio, a taxa de ligação da cetamina atingiu 47% (DAYTON et al., 1983), já em cães, gatos e equinos, utilizando o mesmo método, a ligação foi de 53.5%, 37.5% e 50%, respectivamente (HANNA; BORCHARD, 1988; KAKA; HAYTON, 1980; KAKA; KLAVANO; HAYTON, 1979). Com o emprego da ultrafiltração, a cetamina alcançou 66.5% de ligação à albumina sérica de humanos (SCHMIDT; HOLZGRABE, 2024) e 65% de ligação às proteínas totais de felinos (MOTTA, 2022).

Logo, a mensuração desse parâmetro se torna interessante para ampliar os estudos da farmacologia da cetamina em cães, dado seu uso rotineiro na Medicina Veterinária e a importância de se conhecer o nível de ligação das drogas às proteínas plasmáticas.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi determinar a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas totais de cães por meio de ultrafiltração, mensurada pela técnica de cromatografia

líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização por *electrospray* (HPLC-ESI-MS/MS).

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aplicar o método de ultrafiltração para realizar a separação física da cetamina livre da cetamina ligada às proteínas totais do plasma de cães.

Utilizar a técnica de HPLC-ESI-MS/MS para quantificar a cetamina livre obtida no processo de ultrafiltração e posteriormente calcular a fração da droga ligada às proteínas.

Por fim, a partir desses resultados, calcular a constante de ligação e o coeficiente de Hill.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas descritas a seguir foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos representam a média das análises.

4.1. Coleta de material biológico

As amostras de sangue foram coletadas de cães hígidos, de raças distintas, de ambos os gêneros e com idades entre um e oito anos. Apenas cães clinicamente saudáveis e sem histórico de terapia medicamentosa recente foram incluídos. As amostras foram coletadas por punção da veia jugular e da veia cefálica, em seguida adicionadas a tubos com heparina sódica e, logo após, centrifugadas a 3.500 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos para obtenção do plasma. Posteriormente, as amostras de plasma foram combinadas em uma única solução de *pool* plasmático com volume aproximado de 25 mL.

As concentrações de proteínas totais e de albumina do *pool* plasmático foram determinadas pelos métodos de biureto e enzimático-colorimétrico, utilizando os kits da Labtest Diagnóstica® conforme recomendação do fabricante. O pH plasmático também foi mensurado usando pHmetro marca MS Tecnopon, modelo mPA-210. O plasma foi armazenado sob refrigeração a 4°C por 24 horas antes do uso.

4.2. Dosagem da cetamina pelo método LC-ESI-MS/MS

4.2.1. Preparo das amostras para ultrafiltração da cetamina no plasma

Inicialmente, duas soluções foram preparadas, sendo uma solução estoque de cetamina de 1.000.000 ng/mL em metanol (Merck) e uma solução de tampão fosfato de potássio 20mM + NaCl 150 mM, pH 7,2 (Merck).

Foram preparadas duas séries de microtubos para a determinação da cetamina total (C_T), sendo a primeira chamada de série Plasma e a segunda de Tampão Fosfato. Na série Plasma, concentrações finais variadas de cetamina entre 49 e 1171 ng/mL foram adicionadas em 860 μ L de *pool* plasmático. Na série Tampão Fosfato, as mesmas concentrações finais variadas de cetamina entre 49 e 1171 ng/mL foram adicionadas em 860 μ L de tampão fosfato 20 mM pH 7,2.

Todos os microtubos de ambas as séries foram incubados em banho-maria a 36°C por 20 minutos. Em seguida, foram transferidos 500 μ L de cada microtubo para o concentrador Amicon Ultra® de 0,5 mL, com *cutoff* de 10 kDa e membrana filtrante PES, de baixa ligação com fármacos. A amostra foi centrifugada em temperatura de 30 °C por 30 minutos a 3.500 rpm. Posteriormente, o volume do filtrado (~100 μ L), foi transferido para *inserts* em *vials* de LCMS para realizar a dosagem das concentrações de cetamina correspondentes.

Após a ultrafiltração, a série Plasma foi usada para obter a quantidade de cetamina que não se ligou ao plasma, ou seja, a cetamina livre (C_F). Deste modo, 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) resulta na concentração de cetamina que se ligou às proteínas plasmáticas (C_L).

A série Tampão Fosfato foi preparada com dois objetivos, 1) verificar se a membrana do concentrador poderia reter a cetamina e interferir no resultado, pois como não havia proteínas plasmáticas na série Tampão Fosfato, a concentração do filtrante deveria ser igual ao do filtrado. Desta forma, representando a fração C_T . 2) para dosar a cetamina total (C_T) que teria sido adicionada à série Tampão Fosfato (filtrante), sem a necessidade de extração.

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

A solução de cetamina foi utilizada para otimização dos parâmetros de ionização de modo automático por um equipamento HPLC acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray*, modelo LCMS-8050 (Shimadzu). Posteriormente, foi construída uma curva de calibração em tampão fosfato de potássio 20 mM,

+ NaCl 150 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 (75 mm × 2 mm diâmetro interno, 1.6 µm). Os solventes utilizados foram (A) água e (B) acetonitrila, ambos com 0,1% de ácido fórmico. O fluxo do LC foi utilizado no modo isocrático com 85% de acetonitrila, com fluxo de 0,3 mL/minuto. Os valores das concentrações obtidas em cada ponto corresponderam à média de duas injeções de 10 µL. Os cromatogramas de íons totais (TICs) no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) foram processados pelo programa LabSolutions Insight (Shimadzu) e a área correspondente a cada banda cromatográfica foi utilizada para a 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 (padrão analítico <99%) foi fornecido pela empresa König.

4.2.3. *Dosagem da taxa de ligação da cetamina as 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 obtida 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.

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

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

4.2.4. *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, em que a equação de Hill (Equação 2) foi ajustada aos pontos experimentais.

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

Sendo que 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).

4.2.5. *Análises dos dados*

As áreas dos cromatogramas TICs, no modo MRM foram analisados pelo programa LabSolutions Insight (Shimadzu). O cálculo do pK_a e das frações da cetamina foi realizado pelo programa Marvin View (ChemAxon) e o cálculo da taxa de ligação e da constante de ligação foi feito com o programa Origin-6.0.

5. RESULTADOS

Os parâmetros após otimização para ionização e detecção da cetamina por HPLC-ESI-MS/MS estão apresentados na Tabela 1. Esse processo é necessário para que as concentrações mais baixas de cetamina possam ser identificadas acima do limite de detecção (ruído) inerente ao ensaio.

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

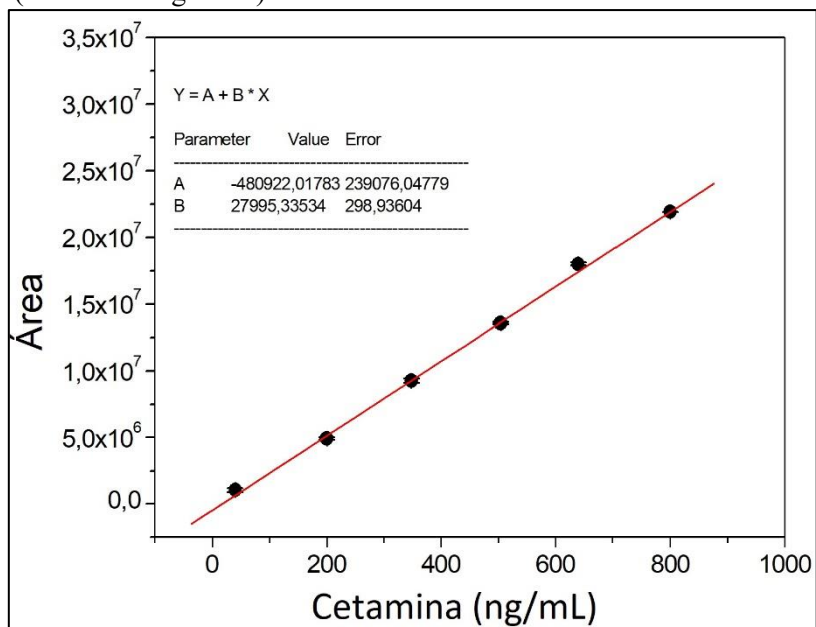
Parâmetro	Valores
Fluxo LC	0.1 mL/min
Concentração solvente B (Acetonitrila)	85%
Temperatura do forno de coluna	40°C
Volume de injeção de amostra	10 µL
Gás de nebulização	3 L/min
Gás de secagem	10 L/min
Gás de aquecimento	10 L/min
Gás de colisão (CID) argônio	270 kPa
Temperatura da interface ESI	200°C
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>	0,100 s

Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

A cetamina foi dissolvida na fase móvel (85% acetonitrila acidificada) para a realização da otimização, pois a presença de solventes polares como a água pode prejudicar a solubilização do fármaco. No decorrer da análise por LC, uma concentração alta de acetonitrila foi mantida na fase móvel, porém com uma porcentagem de água para assegurar a solubilização, ionização e separação de outros componentes do plasma durante a passagem pela coluna.

Em seguida, a curva de calibração para dosagem da cetamina foi construída (Figura 1) utilizando tampão fosfato em pH 7,2, o qual se aproxima das condições do plasma periférico, minimizando um eventual efeito de matriz.

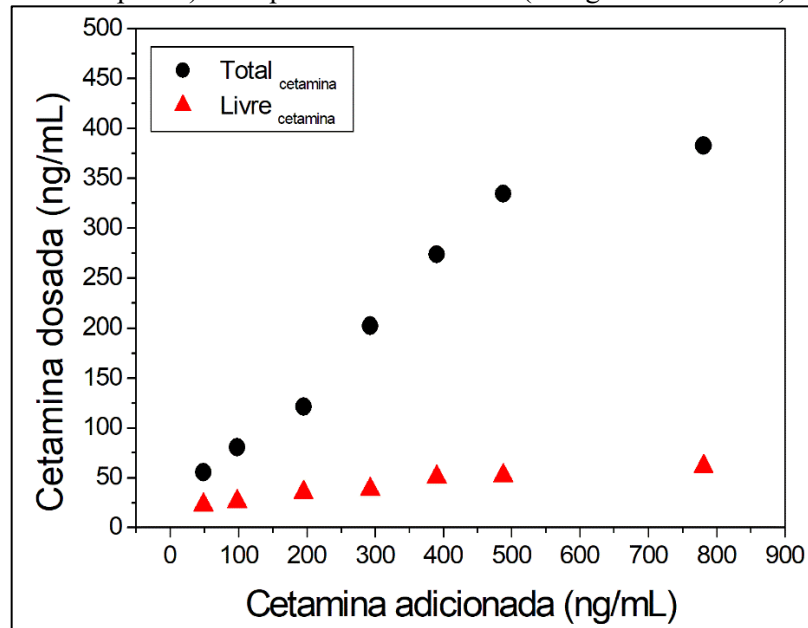
Figura 1 - Curva de calibração para dosagem da cetamina em tampão fosfato de potássio 20 Mm + NaCl 150 mM, pH 7,2. Cada ponto representa a média de três repetições com duas injeções cada (seis cromatogramas).



Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

A Figura 2 retrata os teores de cetamina que foram adicionados em tampão ou em plasma.

Figura 2 - Teores de cetamina dosados em tampão fosfato (filtrante, círculos pretos) e em plasma microfiltrado (triângulos vermelhos).

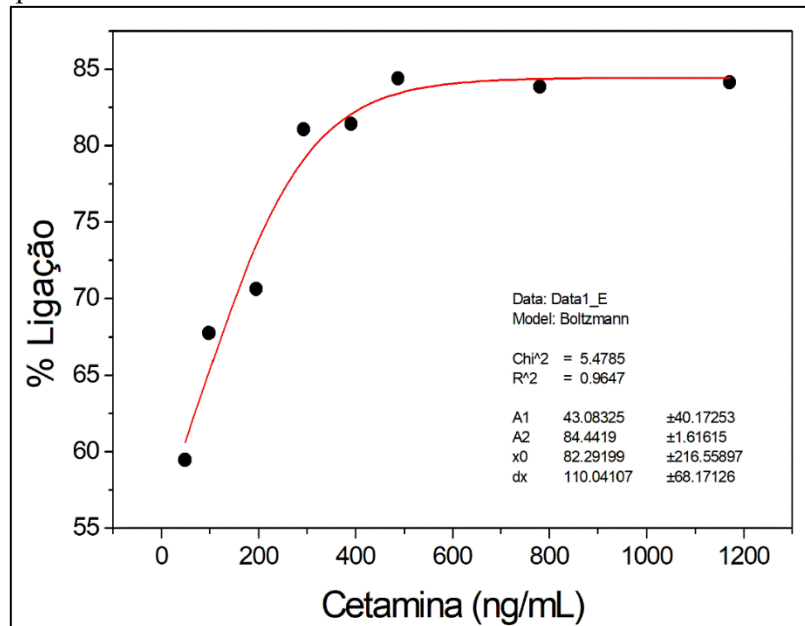


Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

A concentração da Cetamina Total (C_T), representada na Figura 2, 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, fica comprovado que a cetamina não ficou retida na membrana do concentrador quando avaliada em tampão fosfato. Esse critério foi importante para não gerar resultados superestimados da ligação da cetamina às proteínas plasmáticas, fornecendo segurança para a quantificação da C_F na série plasma microfiltrado, pois a diferença entre a C_T (adicionada ao tampão) e a C_F (dosada no plasma microfiltrado) pode ser atribuída inteiramente à cetamina ligada às proteínas plasmáticas (C_L).

Os valores das concentrações de cetamina nas frações C_F e C_T foram aplicados à Equação 1 e, como resultado, a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas foi de 84% quando atingido o pico plasmático acima de 300 ng/mL, conforme exposto na Figura 3.

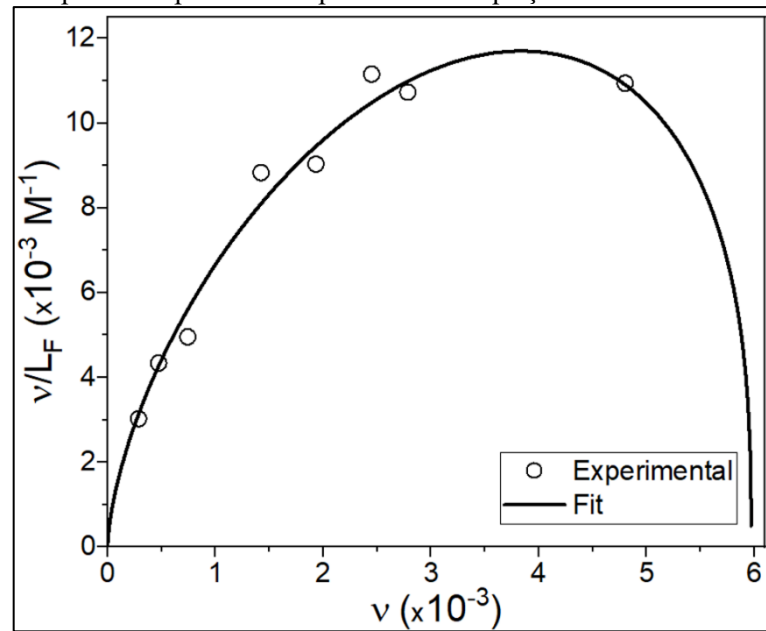
Figura 3 - Taxa de ligação da cetamina às proteínas totais de plasma de cães em função da concentração do fármaco, de acordo com a Equação 1. O tamanho dos círculos tem a dimensão do desvio padrão.



Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

A determinação da constante de ligação (K_b) foi produzida por meio do gráfico de Scatchard quando feito o ajuste da equação aos pontos experimentais, como mostra a figura 4, em que a K_b foi de $3,76 \times 10^6$ mol/mL e o coeficiente de Hill de 2,8.

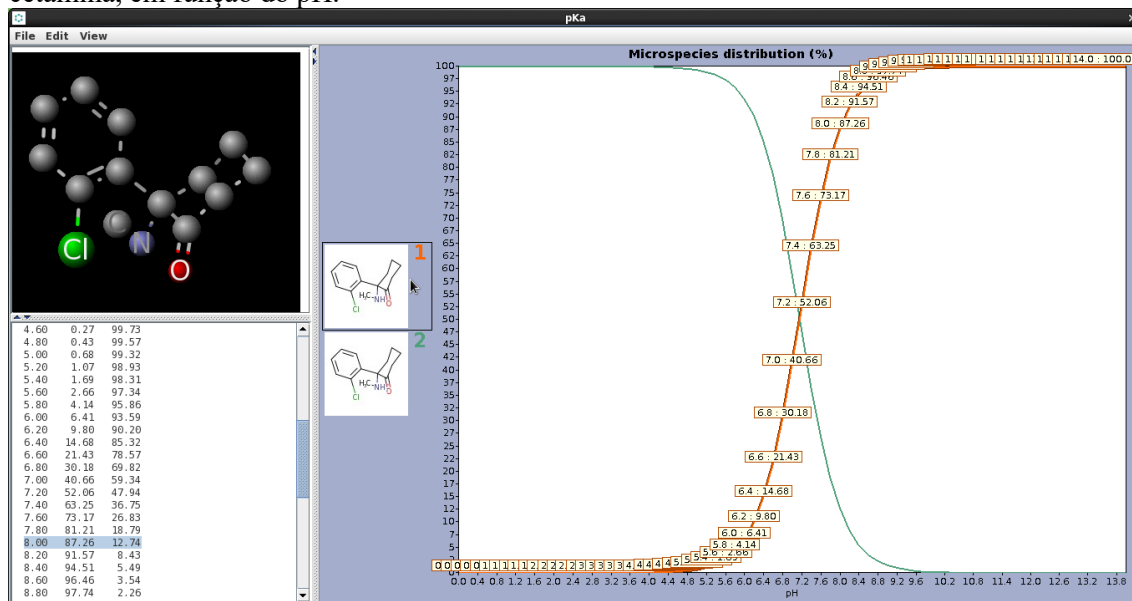
Figura 4 - Gráfico de Scatchard para a ligação da cetamina com proteínas totais do plasma de cães. A linha sólida mostra o ajuste aos pontos experimentais por meio da Equação 2.



Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

Em pH 7,2 cerca de 48% da cetamina está na forma protonada (carga positiva) e 52% na forma desprotonada (sem carga), que é a forma menos solúvel em água (Figura 5), o que faz com que a albumina tenha maior afinidade pela cetamina.

Figura 5 - Frações esperadas das diferentes formas ionizadas da cetamina em função do pH. A linha em laranja representa a fração da forma desprotonada (sem carga, menos solúvel) da cetamina, em função do pH.



Fonte: elaborado pelo Autor (2023).

Os teores de albumina e de proteínas totais mensurados no *pool* de plasma canino foram de 32,0 mg/mL e 51,6 mg/mL respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Foi descrito por Kaka e Hayton (1980) que a taxa da ligação da cetamina foi de 53.5% em cães, mediante diálise de equilíbrio. Nesse trabalho, o plasma foi congelado antes do uso. Já em nosso estudo, utilizamos o método de ultrafiltração seguido da mensuração pelo HPLC-ESI-MS/MS, o que pode justificar o resultado divergente que obtivemos (taxa de ligação máxima de 84%).

Alguns fatores podem influenciar na taxa de ligação das drogas às proteínas plasmáticas, tais como o pH do meio, em que valores elevados de pH resultam no aumento da fração ligada às proteínas (HINDERLING; HARTMANN, 2005). Em condições fisiológicas, o pH sanguíneo varia de 7,35 a 7,45. Esses valores tendem a aumentar após a coleta e estocagem da amostra (pH>8,0) (TOMA et al., 2021). Em nossa pesquisa, o valor do pH do *pool* de plasma atingiu 7,25. Esse plasma foi armazenado sob refrigeração a 4 °C por, no máximo, 24 horas antes do uso.

Hijazi e Boulieu (2002) constataram, por meio do método de ultrafiltração, que a temperatura influenciou na fração ligada às proteínas, uma vez que a ligação da cetamina às

proteínas totais de humanos foi em média de 69% e 75% a 30°C e 20°C, respectivamente. Durante as análises realizadas, mantivemos a temperatura em 36°C, para que se aproximasse da temperatura fisiológica, bem como para comparar os nossos resultados com trabalhos que usaram a mesma temperatura.

A albumina é a principal proteína presente no plasma, atingindo concentrações de 31,7 mg/mL em cães (MOORE; AVERY, 2019). Como a maioria dos fármacos se liga a essa proteína, em casos de hipoalbuminemia, a fração livre da droga será maior, principalmente para fármacos que possuem alta taxa de ligação, logo o aumento da fração livre levará à intensificação dos efeitos farmacológicos. Em humanos foi demonstrado que a fração livre do ácido valpróico, droga antiepilética, aumentou entre seis a sete vezes em pacientes críticos, apresentando hipoalbuminemia, quando comparado a pacientes saudáveis (CELESTIN; MUSTEATA, 2021). O teor de albumina no *pool* de plasma usado nesse estudo foi de 32,0 mg/mL, quando dosado pelo método enzimático-colorimétrico. Esse valor está dentro do esperado para cães saudáveis.

O coeficiente de Hill positivo (2,8) indica que há cooperatividade positiva para a ligação de um ligante a uma proteína. Sugerimos que esse fato se deve à ligação da cetamina especialmente à albumina, pois trata-se da proteína mais abundante do plasma e sabidamente possui múltiplos sítios de ligação e alta afinidade por fármacos lipossolúveis (SPADA et al., 2021). Em um estudo feito por Motta (2021) em gatos, foi demonstrada cooperatividade positiva na ligação da cetamina à albumina ($n_H=2,3$) com taxa de ligação às proteínas plasmáticas de 65% em 30°C (MOTTA, 2021).

O valor de K_b tem importância na farmacocinética, visto que influencia na distribuição de uma droga no sangue, pois é a forma livre do fármaco que irá exercer sua atividade farmacológica (JAHANBAN-ESFAHLAN; PANAHI-AZAR; SAJEDI, 2015). A K_b obtida em nosso trabalho foi de $3,76 \times 10^6$ mol/L. Já no estudo realizado por Motta (2021), a K_b na espécie felina foi de 2×10^6 mol/L. Logo a afinidade da cetamina pela albumina de cães é 1,76 vezes maior do que a de gatos. Um dos fatores que justifica a alta afinidade da cetamina pela albumina é a sua baixa solubilidade ($xlogP$ de 2,2) em comparação com outros fármacos, principalmente devido a sua variação de carga em pHs fisiológicos, demonstrado na figura 5 acima. Em geral, o $xlogP$ relaciona-se com a ligação dos compostos às proteínas, em que fármacos mais lipossolúveis possuem taxa de ligação maior (DAVIDSEN et al., 2020).

Em comparação, a N-Acetyl-L-cysteína apresentou K_b de $1,1 \times 10^3$ mol/L para a albumina de soro bovino a 30°C (JAHANBAN-ESFAHLAN, et al., 2015). Este fármaco possui carga negativa em pHs acima de 4,0 e $xlogP$ de 0,4, o que justifica ter muito menos afinidade pela albumina do que a cetamina.

Assim os resultados encontrados neste trabalho se mostraram condizentes com os valores esperados para este fármaco, dadas as suas propriedades físico-químicas.

7. CONCLUSÃO

A aplicação do método de ultrafiltração seguido da mensuração pela técnica de HPLC-ESI-MS/MS foi utilizada para determinar a taxa de ligação da cetamina às proteínas plasmáticas de cães, cujo resultado mostrou que 84% do fármaco se liga a proteínas plasmáticas em concentrações acima de 300 ng/mL. A constante de ligação (K_B) encontrada em nossos ensaios foi de $3,76 \times 10^6$ mol/L com coeficiente de Hill de 2,8, o que significa cooperatividade no processo e que mais de uma molécula deste fármaco pode se ligar as proteínas plasmáticas, com maior probabilidade na albumina, nestas condições. Os dados encontrados neste trabalho possuem relevância farmacológica, visto que podem contribuir em futuros estudos farmacocinéticos da cetamina em cães.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa König Brasil S/A pela colaboração no fornecimento dos fármacos para este estudo, o CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro e FINEP/COMCAP/UEM pelo uso dos equipamentos.

8. REFERÊNCIAS

BOHNERT, T.; GAN, L.-S. Plasma protein binding: from discovery to development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 9, p. 2953–2994, 2013.

CELESTIN, M. N.; MUSTEATA, F. M. Impact of changes in free concentrations and drug-protein binding on drug dosing regimens in special populations and disease states. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 10, p. 3331–3344, 2021.

DAVIDSEN, A. B. et al. Ketamine analogues: comparative toxicokinetic in vitro–in vivo extrapolation and quantification of 2-fluorodeschloroketamine in forensic blood and hair samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 180, p. 113049, 2020.

DAYTON, P. G. et al. The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 825–831, 1983.

DIMITRIJEVIC, D. et al. Rapid equilibrium dialysis, ultrafiltration or ultracentrifugation? Evaluation of methods to quantify the unbound fraction of substances in plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 651, p. 114–120, 2023.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. Metabolism and metabolomics of ketamine: a toxicological approach. **Forensic Sciences Research**, v. 2, n. 1, p. 2–10, 2017.

HANNA, R. M.; BORCHARD, R. E. Plasma protein binding of ketamine and metabolite I in the cat. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 11, n. 1, p. 115–117, 1988.

HIJAZI, Y.; BOULIEU, R. Protein binding of ketamine and its active metabolites to human serum. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 37–40, 2002.

HINDERLING, P. H.; HARTMANN, D. The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, n. 1, p. 71–85, 2005.

HOWARD, M. L. et al. Plasma protein binding in drug discovery and development. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 2, p. 170–187, 2010.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; PANAHI-AZAR, V.; SAJEDI, S. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction between N-acetyl cysteine and bovine serum albumin. **Biopolymers**, v. 103, n. 11, p. 638–645, 2015.

KAKA, J. S.; HAYTON, W. L. Pharmacokinetics of ketamine and two metabolites in the dog. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 193–202, 1980.

KAKA, J. S.; KLAVANO, P. A.; HAYTON, W. L. Pharmacokinetics of ketamine in the horse. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 7, p. 978–981, 1979.

KOHTALA, S. Ketamine — 50 years in use: from anesthesia to rapid antidepressant effects and neurobiological mechanisms. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 2, p. 323–345, 2021.

KRATOCHWIL, N. A. et al. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 9, p. 1355–1374, 2002.

MIHALJEVIĆ, S. et al. Therapeutic mechanisms of ketamine. **Psychiatria Danubina**, v. 32, n. 3–4, p. 325–333, 2020.

MION, G.; VILLEVIEILLE, T. ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 19, n. 6, p. 370–380, 2013.

MOORE, A. R.; AVERY, P. R. Protein characterization using electrophoresis and immunofixation; a case-based review of dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 48, p. 29-44, 2019.

MOTTA, V. **Determinação da taxa de ligação da cetamina às proteínas totais do plasma de gatos domésticos pela técnica HPLC-ESI-MS/MS**. Umuarama: Universidade Estadual de Maringá, 2022.

OTAGIRI, M. Study on binding of drug to serum protein. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 129, n. 4, p. 413-425, 2009.

PAI, A.; HEINING, M. Ketamine. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 7, n. 2, p. 59–63, 2007.

SCHMIDT, S.; HOLZGRABE, U. Do the enantiomers of ketamine bind enantioselectively to human serum albumin?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 192, p. 106640, 2024.

SPADA, A. et al. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 5, p. 1862–1894, 2021.

TAYYAB, S.; FERROZ, S. R. Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 123, p. 193-218, 2021.

TOMA, C. M. et al. Ultrafiltration method for plasma protein binding studies and its limitations. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1–7, 2021.

TRAINOR, G. L. The importance of plasma protein binding in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 51–64, 2007.

WAGNER, A. E. et al. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 1, p. 72–75, 2002.

WILSON, G. S. Ketamine: old dogs, new tricks. **Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia**, v. 19, n. 1, p. 24–26, 2013.

ANEXO I:



Universidade Estadual de Maringá
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LIGAÇÃO DE AZAPERONE, CETAMINA E MIDAZOLAM AS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS.", protocolada sob o CEUA nº 4557170323 (ID 003663), sob a responsabilidade de **Flavio Augusto Vicente Seixas e equipe; Marilda Onghero Taffarel; Gabriela Godoi Marques; Samara Bossa Aleixo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 14/04/2023.

We certify that the proposal "DETERMINATION OF THE BINDING RATE OF AZAPERONE, KETAMINE AND MIDAZOLAM TO PLASMA PROTEINS OF DOMESTIC ANIMALS", utilizing 10 Swines (males or females), 10 Ovines (males or females), 10 Equines (males or females), 10 Bovines (males or females), 10 Cats (males or females), 10 Dogs (males or females), protocol number CEUA 4557170323 (ID 003663), under the responsibility of **Flavio Augusto Vicente Seixas and team; Marilda Onghero Taffarel; Gabriela Godoi Marques; Samara Bossa Aleixo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 04/14/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2023 a 05/2024** Área: **Dmv-Medicina Veterinária**

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 8 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Suínos						
Linhagem:	qualquer			Peso:	30 a 300 kg		
Origem:	Hospital Veterinário da UEM	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 20 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Ovinos						
Linhagem:	qualquer			Peso:	30 a 150 kg		
Origem:	Hospital Veterinário da UEM	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 20 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Equídeos						
Linhagem:	qualquer			Peso:	100 a 600 kg		
Origem:	Hospital Veterinário da UEM	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 20 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Bovinos						
Linhagem:	qualquer			Peso:	60 a 600 kg		
Origem:	Animais de Proprietários	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 12 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Gatos						
Linhagem:	qualquer			Peso:	3 a 10 kg		
Origem:	Animais de Proprietários	sexo:	Machos ou Fêmeas	idade:	1 a 12 anos	Quantidade:	10
Espécie:	Cães						
Linhagem:	qualquer			Peso:	5 a 60 kg		

Maringá, 30 de junho de 2023

