



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

**PERFIL FARMACOCINÉTICO DO METAMIZOL ISOLADO E ASSOCIADO AO
TRAMADOL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM ASININOS**

MOSSORÓ-RN

2021

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

**PERFIL FARMACOCINÉTICO DO METAMIZOL ISOLADO E ASSOCIADO AO
TRAMADOL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM ASININOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientadora: Valéria Veras de Paula, Prof^a. Dra.

MOSSORÓ-RN

2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B141p Barbalho de Macêdo, Luã.

PERFIL FARMACOCINÉTICO DO METAMIZOL ISOLADO E ASSOCIADO AO TRAMADOL APÓS ADMINISTRAÇÃO

INTRAVENOSA EM ASININOS / Luã Barbalho de Macêdo.

- 2021.

84 f. : il.

Orientadora: Valéria Veras de Paula.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2021.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas

da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO

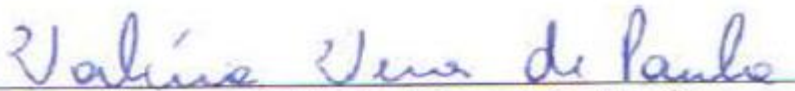
**PERFIL FARMACOCINÉTICO DO METAMIZOL ISOLADO E ASSOCIADO AO
TRAMADOL APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA EM ASININOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

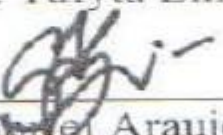
Defendida em: 26 / 02 / 2021.

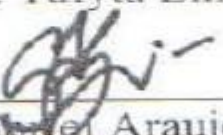
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dra. Valéria Veras de Paula


Prof. Dr. Raimundo Alves Barreto Júnior


Profa. Dra. Talyta Lins Nunes


Prof. Dr. Gabriel Araujo da Silva


CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA:03597959431
Assinado eletronicamente por:
CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA:03597959431
Data: 2021.02.26 17:10:10 -02'00'

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUÃ BARBALHO DE MACÊDO possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi Árido (2013). Residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos animais pela Universidade federal rural do Semi Árido (2014). Mestrado em Ciência Animal pela UFERSA (2017) pesquisando a influência da leptina sobre o ciclo estral de preás (*Galea spixii*). Em janeiro de 2017, iniciou seu doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, sob orientação da Prof.^a Dra. Valéria Veras de Paula. Durante esse período, pesquisou o efeito do tramadol e metabólitos sobre o perfil farmacocinético do Metamizol em asininos utilizando a Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC), com período sanduíche na Universidad Autónoma de San Luis Potosí no México.

.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Teresa Cristina Barbalho de Macêdo** e **Antônio Willame Cabral de Macêdo**, que sempre foram exemplo de superação, nunca deixaram de me apoiar e sempre me deram tudo que precisei para que eu crescesse na vida. Pelo amor incondicional, pelas críticas e pelos elogios no tempo certo. Ensinarão-me que mesmo que os obstáculos sejam intransponíveis, com trabalho e dedicação é possível transpassá-los. Palavras não podem expressar o sentimento que tenho por eles.

As “cabritas”, **Capitu** e **Cristal** (*in memorian*), a **Dora** (*in memorian*) e a **Toquinho**, agradeço por me fazer uma pessoa melhor, ter responsabilidade, enxergar a vida com outros olhos, ensinando o que realmente é lealdade. Acima de tudo, me mostraram que na vida a gente não precisa de fama e fortuna e sim de um cobertor para aquecer, uma bola para perseguir, um prato de ração, uma tigela de água para suprir as necessidades e um pouquinho de molecagem e biscozinhos para nos sentirmos vivos e sermos realizados.

Aos meus parentes, tia **Kaká Barbalho**, tio **Cláudio Fontoura**, as minhas primas **Tahyará Barbalho** e **Tahyná Barbalho**, ao meu avô **Gilberto Barbalho**, vovó **Maria das Neves** (*in memorian*), aos meus irmãos **Rhudá Barbalho** e **Jivago Barbalho** (e suas esposas **Raquel Marques** e **Raquel Campos** respectivamente) e demais familiares, por me incentivarem direta ou indiretamente, mesmo eu tendo abdicado, muitas vezes, de sua companhia para alcançar um objetivo maior.

A **Rosely Barbosa**, que é para mim uma segunda mãe. Cuidou de mim, me educou, nunca deixou de me incentivar. Exemplo de superação. Mostrou que nunca é tarde para se realizar um sonho, mesmo que para isso tenhamos que sacrificar muitas coisas. Ensinou-me a abrir mão do que amamos para conquistar aquilo que sonhamos.

A **Muriel Pimentel**, minha companheira, de tantas alegrias e de tantas tristezas. Foi parceira nos momentos em que mais precisei e soube me motivar quando desistir parecia ser a melhor opção. Mesmo distante é fonte de orgulho, perseguiu seus sonhos e agora está usufruindo deles.

A minha orientadora professora doutora **Valéria Veras de Paula** muito obrigado pela convivência, orientação e crença em minhas capacidades, que proporcionaram esta pequena

contribuição à Ciência. Gostaria de agradecer também a oportunidade de cursar a pós-graduação e pelo doutorado sanduíche.

Ao professor doutor **Carlos Eduardo Bezerra de Moura** e a sua família, **Maria Teresa** e a **Vitória Moura** pelo acolhimento, amizade, ensinamentos, compreensões, motivações, palavras não são suficientes para agradecer tamanho carinho.

A todos os professores que compõem o corpo docente da Universidade Federal Rural do Semiárido, em especial aos professores doutores **Genílson Fernandes de Queiroz**, **Moacir Franco Oliveira** e **Raimundo Alves Barreto Junior** pelos conhecimentos passados durante todos esses longos anos de casa. Sou o profissional que sou hoje, graças a cada um de vocês.

A todos da **FS Scientia Pharma** em especial a **Carlos Estrada**, **Alejandro Servantes**, **Ramon Vazquez**, **Rosário Torres**, **Sheila Yarazet**, **Abigail Miranda**, **Laura Martinez**, **Oli Bermudez**, **Jorge Gutierrez**, **David Esquivel**, **Lizbeth Rodriguez**, **Paola Zaraté**, **Nathali Bautista** pela acolhida no México transformando a minha estadia em seu país uma experiência extremamente agradável, tiveram muita paciência para compreender meu “portunhol” e estiveram sempre dispostos a me ensinar tudo que sabiam.

Ao professor Doutor **José Trinidad Pérez Urizar** pela oportunidade e confiança depositadas para que eu pudesse vivenciar a farmacocinética em seus laboratórios e assim pudesse desenvolver minha tese da melhor maneira possível.

Aos professores doutores **Gabriel Araújo Silva** e **Lilian Solón** pela paciência e para me passar o máximo de conhecimento para que eu pudesse desenvolver essa tese esse trabalho também é mérito dos senhores.

A **Fernanda Araújo dos Santos**, parceira de Pós-graduação, sempre disposta a ajudar. Obrigado pelos momentos de descontração, pela confiança e pelas parcerias que fizemos.

Aos meus amigos **Renata Xavier**, **Jeane Paiva**, **Maressa Laíse**, **Felipe Câmara**, **Thais Kazimoto** e **Rosana Aires** pelo apoio e pelos momentos agradáveis que tivemos durante todos esses anos de UFERSA.

Aos meus colegas de pós-graduação **Janine Karla Braz, Andressa Mouta, Hélio Noberto, Ferdinando Bezerra, Igor Renno, Manuela Costa, Gláucia Carlos, Beatriz Dantas, João Paulo Albuquerque** e **Luan Rodrigues** pela companhia durante todos esses anos de mestrado e doutorado.

A **CAPES** e **CNPq** pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

“Se você for tentar, vá até o fim.

Senão, nem comece.

Vá até o fim.

Isso pode significar perder

Amores, amigos, empregos e talvez

Até a cabeça.

Vá até o fim.

Isso pode significar três ou

Quatro dias sem comer.

Isso pode significar congelar

No banco de um parque.

Isso pode significar deboche,

Rejeição. Solidão.

Solidão? Pense nela como um

Presente.

E em todo o resto como um

teste à sua persistência.

O tamanho da sua vontade

De chegar lá.

Você vai chegar.

E vai ser melhor que qualquer

Coisa que você possa imaginar.

Vá até o fim.

Você nunca vai estar sozinho.”.

Jogue os dados - Charles Bukowski

De Macêdo, Luã Barbalho. **Perfil farmacocinético do metamizol isolado e associado ao tramadol após administração intravenosa em asininos**. 2021. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Morfofisiologia e biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2021.

RESUMO – A extrapolação empírica dos protocolos terapêuticos indicados para animais, embora uma prática rotineira, não leva em consideração as particularidades de cada espécie, elevando os riscos de baixa eficácia nos tratamentos seja por subdoses seja por sobredoses. Objetivou-se avaliar o perfil farmacocinético do metamizol administrado por via intravenosa de forma isolada e em associação com tramadol em asininos. Foram utilizados 10 jumentos machos, saudáveis e inteiros. Os dez animais integraram todos os grupos do estudo, sendo realizado um período de descanso entre tratamentos de 15 dias. Os animais receberam quatro tratamentos. No tratamento M₁₀ metamizol na dose de 10 mg/kg, M₂₅ – metamizol 25mg/kg e M₁₀T₂ - 10 mg/kg de metamizol associado a 2mg/kg de tramadol e no M₂₅T₂, 25 mg/kg de metamizol com 2mg/kg de tramadol. Todos os tratamentos foram feitos em dose única e por via intravenosa. Após tempos pré-determinados, foram coletadas amostras de sangue para posterior análise. Alíquotas de plasmas foram processadas e injetadas no sistema cromatográfico de ultra performance acoplado a espectrômetro de massa (UPLC-MS/MS). Durante as coletas, os animais eram observados para possíveis manifestações adversas. Os parâmetros avaliados foram: a concentração plasmática máxima (C_{max}), o tempo para atingir a C_{max} (T_{max}), a área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero até ao momento da última concentração mensurável (AUC_{0→t}) e a extrapolação da AUC até ao infinito (AUC_{0→∞}), volume de distribuição aparente (V_z/F), depuração aparente (CL/F), constante de eliminação (K_e); meia-vida de eliminação (t_{1/2}); Tempo médio residual até o momento da última mensuração (MRT_{0→t}), Tempo médio residual do momento zero até o infinito (MRT_{0→∞}), para os fármacos e seus principais metabólitos. Nos grupos M₁₀ e M₂₅, os parâmetros AUC_{0→t}, AUC_{0→∞}, C_{max} apresentaram um aumento significativo nos dois metabólitos do metamizol nos animais do grupo M₂₅. Enquanto que o T_{max}, V_z/F e o CL/F não tiveram diferença estatística entre os grupos. Após administração intravenosa dos tratamentos M₁₀T₂ e M₂₅T₂, o TRA, MAA, AA foram detectados em até 24 horas de análise e o M1 até 12 horas. Analisando o metabólito do TRA, observou-se que a AUC_{0→∞} e o CL/F foi maior no grupo tratado com 10mg/kg de metamizol quando comparado com o de 25 mg/kg. Enquanto o t_{1/2}; MRT_{0→∞}; MRT_{0→t} apresentam-se significativa maiores no grupo M₂₅T₂. Em relação ao seu subproduto, o M1, o t_{1/2}; MRT_{0→∞}; MRT_{0→t} apresentaram-se significativamente maiores no segundo grupo. O V_z/F; MRT_{0→∞}, t_{1/2} do MAA e o MRT_{0→t} do AA variou significativamente entre os grupos sendo maiores nos animais que receberam 25mg/kg de Metamizol. Com base nos resultados é possível afirmar que obteve êxito uma vez que foi possível desenvolver método analítico capaz de detectar e quantificar ambos os fármacos e seus principais metabólitos no sangue de asinino por até 48 horas. Além disso, comprovou que existem alterações em alguns parâmetros farmacocinéticos quando há administração de diferentes doses de metamizol e que as mesmas interferem no metabolismo do próprio metamizol como também tramadol e de seu metabólito mais ativo, o O-desmetiltramadol e que esses achados podem subsidiar futuros ensaios clínicos para eficácia analgésica ou mesmo estabelecer posologia adequada para jumentos

Palavras-Chave: Analgésicos, equídeos, metabólitos, dipirona, farmacocinética.

De Macêdo, Luã Barbalho. **Pharmacokinetic profile of metamizole alone and associated with tramadol in donkeys.** 2021. 84f. Thesis (Doutorado em Ciência Animal: Morfofisiologia e biotecnologia Animal) – Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), Mossoró – RN, 2020.

ABSTRACT - The empirical extrapolation of the therapeutic protocols indicated for animals, although a routine practice, does not take into account the particularities of each species, increasing the risks of low efficacy in treatments, either by underdoses or by overdoses. The objective was to evaluate the pharmacokinetic profile of metamizole administered intravenously in isolation and in association with tramadol in donkeys. The ten animals were included in all study groups, with a 15-day rest period between treatments. The animals received four treatments. In the treatment M10 metamizole at a dose of 10 mg/kg, M25 - metamizole 25mg/kg and M10T2 - 10 mg/kg of metamizole combined with 2mg/kg of tramadol and in M25T2, 25 mg/kg metamizole with 2mg/kg tramadol. All treatments were performed in a single dose and intravenously. After predetermined times, blood samples were collected for further analysis. Plasma aliquots were processed and injected into the ultra-performance chromatographic system coupled to a mass spectrometer (UPLC-MS / MS). During the collections, the animals were observed for possible adverse manifestations. The parameters evaluated were: the maximum plasma concentration (C_{max}), the time to reach the C_{max} (T_{max}), the area under the plasma concentration curve from time zero until the moment of the last measurable concentration ($AUC_0 \rightarrow t$) and the extrapolation of the AUC to infinity ($AUC_0 \rightarrow \infty$), apparent volume of distribution (V_z/F), apparent clearance (Cl/F), elimination constant (K_e); elimination half-life ($t_{1/2}$); Mean residual time until the last measurement ($MRT_0 \rightarrow t$), Mean residual time from zero to infinity ($MRT_0 \rightarrow \infty$), for drugs and their main metabolites. In groups M₁₀ and M₂₅, the parameters $AUC_0 \rightarrow t$, $AUC_0 \rightarrow \infty$, C_{max} showed a significant increase in the two metabolites of metamizole in animals in the group M₂₅. While T_{max} , V_z / F and Cl / F had no statistical difference between groups. After intravenous administration of treatments M₁₀T₂ and M₂₅T₂, TRA, MAA, AA were detected within 24 hours of analysis and M1 up to 12 hours. Analyzing the TRA metabolite, it was observed that $AUC_0 \rightarrow \infty$ and CL / F were higher in the group treated with 10mg/kg of metamizole when compared to the 25mg/kg group. While the $t_{1/2}$; $MRT_0 \rightarrow \infty$; $MRT_0 \rightarrow t$ are significantly higher in the M₂₅T₂ group. Regarding its by-product, M1, $t_{1/2}$; $MRT_0 \rightarrow \infty$; $MRT_0 \rightarrow t$ were significantly higher in the second group. The V_z / F ; $MRT_0 \rightarrow \infty$, $t_{1/2}$ of MAA and $MRT_0 \rightarrow t$ of AA varied significantly between groups, being higher in animals that received 25mg/kg of Metamizole. Based on the results, it is possible to state that it was successful since it was possible to develop an analytical method capable of detecting and quantifying both drugs and their main metabolites in donkey blood for up to 48 hours. In addition, it proved that there are changes in some pharmacokinetic parameters when different doses of metamizole are administered and that they interfere with the metabolism of metamizole itself as well as tramadol and its most active metabolite, O-desmethyltramadol and that these findings may support future clinical trials for analgesic efficacy or even establish an appropriate dosage for donkeys.

Keywords: analgesics, equidae, metabolites, dipyrrone, pharmacokinetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental.....	29
-------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cronograma das coletas de sangue dos asininos após administração de metamizol e tramadol por via intravenosa	30
Tabela 2: Relação massa e carga (m/z) dos íons principais e íons filhos do tramadol, O-desmetiltramadol (M1), 4-metilaminoantipirina (MAA), 4-aminoantipirina (AA) e metoprolol (Padrão interno).	32
Tabela 3: Faixa de trabalho das curvas de calibração e concentração dos pontos controles para validação dos métodos analíticos	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – 4-aminoantipirina

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

$AUC_{0-\infty}$ - Área da curva extrapolada ao infinito

AUC_{0-t} – Área da curva no tempo 0 até o último tempo detectável

CL/F – Depuração aparente

C_{max} – Concentração plasmática máxima

COX – Cicloxigenase

DIP – Dipirona

EDTA – Etileno Diamino Tetra-Acético

EMA - Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos

ESI – Ionização por electropulverização

FDA - Food and Drug Administration

GMP – Monofosfato de Guanosina

ICH – Conferência Internacional sobre Harmonização

K_e – Constante de eliminação

LC-MS/MS – Cromatografia líquida com Espectrômetro de Massas

LLOQ – Limite Inferior de Quantificação

M1 – O-desmetiltramadol

M2 – N-desmetiltramadol

M3 – N,N-Didesmetiltramadol

M4 – N,N,O-Tridesmetiltramadol

M5 – N,O-Didesmetiltramadol

MAA – 4-Metilamina Antipirina

MAO – Monoamino oxidase

min – Minutos

MRM – Monitoramento de Reações múltiplas

MRT - Tempo médio residual do momento

MS – Espectrômetro de massa

MT – Metamizol

NA – Não aplica

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

$t_{1/2}$ – Meia Vida de eliminação

$T_{\max}$ – Tempo para atingir a concentração máxima

TRA – Tramadol

UPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

V/F – Volume de distribuição aparente

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

' – Minutos

® - Marca Registradas

μ - Receptor Mi

μm – Micrometro

h – Hora

L.min⁻¹- Litros por minuto

mg/kg – Miligramas por quilo

mL. min⁻¹- Milímetros por minuto

mm – Milímetros

ng.mL⁻¹- Nanogramas por mililitros

°C – Graus Centígrados

V – Voltagem

κ – Receptor Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. HIPÓTESES.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. REVISÃO DE LITERATURA	22
4.1. Analgesia em equídeos	22
4.2. Metamizol.....	23
4.3. Tramadol.....	25
4.4. Interação entre fármacos.....	27
5. REFERÊNCIAS	35
6. METODOLOGIA	29
6.1. Reagentes Químicos	29
6.2. Comitê de ética e desenho experimental.....	29
6.3. Extração das amostras	31
6.4. Condições analíticas (LC-MS/MS).....	31
6.5. Validação.....	32
6.6. Análise farmacocinética e estatística	33
Capítulo 1: Artigo Farmacocinética da Dipirona	41
Capítulo 2: Artigo Farmacocinética da dipirona e do tramadol	64

1. INTRODUÇÃO

Os asininos são animais que trabalham, principalmente nos países em desenvolvimento, para transportar mercadorias e pessoas, muitas vezes em calor e umidade extremos, em ambientes de trabalho urbano, onde há riscos de lesões devido ao tráfego pesado e a poluição (REGAN et al., 2014; DAI et al., 2016). Esses fatores predispõem os animais a traumas e outras patologias que podem estar associados a processos dolorosos e estresse.

A dor em equídeos pode ser bastante debilitante sendo a principal responsável por eutanásia em consequência de patologias como, por exemplo, a laminite ou a síndrome cólica (MATTHEWS; CARROLL, 2007). O tratamento da dor é importante para o bem-estar e higidez de equídeos. Atualmente a medicina veterinária dispõe de poucos medicamentos licenciados para o controle da dor para essa espécie (TAVANAEIMANESH et al., 2018).

O metamizol (MT), também conhecido como dipirona (DIP), é de particular interesse para os veterinários de equinos, pois é indicada no tratamento de cólicas, dores musculares, febres e após intervenções cirúrgicas por se tratar de um bom analgésico e um excelente antipirético (COOK et al., 2015; GIORGI et al. 2017; ZARO et al., 2018). Porém, devido a acusações de possíveis efeitos colaterais em seres humanos, a agranulocitose, seu uso foi proibido em humanos como também em animal de produção em vários países como: Estados Unidos, Japão, Irã e no Reino (HEDENMALM; SPIGSET, 2002) e provavelmente devido a essa proibição é que sua farmacocinética é pouco estudada. Sua dose rotineira é 25 mg/kg (AUPUNUN et al., 2016), entretanto em estudos utilizando várias doses deste medicamento em camundongos verificou-se que a dose de 10mg/kg era a maior dose a não causar reações adversas (EMEA, 2003).

O Tramadol (TRA) é um analgésico opioide muito prescrito por veterinários (ABBIATI et al., 2017). É usado rotineiramente no tratamento de dores musculoesqueléticas, pós-operatórias e crônicas em animais (UDEGBUNAM et al., 2015; BORTOLAMI et al., 2015). Estudos farmacológicos do tramadol e de seus principais metabólitos indicaram diferenças interespecies no metabolismo das drogas, apoiando o fato de que os estudos farmacocinéticos são necessários para determinar os regimes de dosagem para cada uma delas (CAGNARDI et al., 2011; SHEIKHOLESLAMI et al., 2016. EVENSON; MANS, 2019). Em um estudo avaliando o perfil farmacocinético do tramadol e seu principal metabólico (M1) em asininos verificou-se que não havia alterações significativas no perfil farmacocinético quando utilizava-

se dose 2 e 4 mg/kg. Entretanto havia uma maior incidência de reações adversos na maior dose (MOUTA et al., 2020)

A administração combinada de opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) pode produzir efeitos aditivos ou supraditivos ao mesmo tempo em que reduz efeitos indesejados (MORENO-ROCHA et al., 2016). Em estudos prévios realizados com camundongos, foram testadas 25 diferentes combinações de doses de metamizol associado ao tramadol ambos em aplicação única e em todas elas observou-se efeito antinoceptivos aditivos ou potencializados quando comparado com o tratamento usando as drogas isoladamente além da redução de efeitos colaterais como a diminuição no tempo de trânsito intestinal (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2013).

A farmacologia de diversas drogas é pouco compreendida em asininos devido à falta de estudos farmacocinéticos nesta espécie e muitas vezes os medicamentos, doses e intervalos de administração usados são baseados em tratamentos prescritos para equinos. Além disso, os asininos diferem dos equinos em termos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (MATTHEWS; VAN LOON, 2013). Sendo, o conhecimento das propriedades farmacocinéticas dos medicamentos fundamental para garantir uma administração terapêutica eficaz e segura (ABBIATI et al., 2017)

Portanto, esta tese tem como objetivo desenvolver e validar um método para avaliar o perfil farmacocinético do metamizol e de seus metabólitos quando o mesmo é administrado isoladamente na dose de 10 e 25 mg/kg. Assim como a farmacocinética do metamizol e de seus metabólitos quando administrado em associação com o tramadol na dose de 2mg/kg sendo todos administrados em dose única e por via intravenosa em asininos.

2. HIPÓTESES

A – Existem diferenças no perfil farmacocinético do metamizol e de seus principais metabólitos após o aumento da dose

B – O tramadol e o metamizol interferem na farmacocinética um do outro.

C – A aplicação de metamizol em diferentes doses, assim como elas associadas ao tramadol não causam efeitos colaterais em asininos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estabelecer o perfil farmacocinético do metamizol após administração única por via intravenosa de forma isolada e em associação ao tramadol em asininos.

3.2. Objetivos Específicos

Validar metodologia analítica para determinação do metamizol e seus metabólitos, 4-Metilaminaantipirina (MAA) e o 4-aminoantipirina (AA), em plasma sanguíneo asinino;

Validar metodologia analítica para a determinação da associação de metamizol e tramadol em plasma asinino.

Mensurar a concentração plasmática do metamizol e seus metabólitos após aplicação intravenosa ao longo de 48 horas

Quantificar as concentrações plasmáticas do metamizol, MAA, AA, tramadol e M1 após aplicação intravenosa do metamizol e do tramadol ao longo de 48 horas.

Determinar o perfil farmacocinético do metamizol e seus metabólitos ativos na dose de 10 e 25 mg/kg

Mensurar os parâmetros farmacocinéticos da associação metamizol nas doses de 10 e 25 mg/kg com tramadol na dose de 2 mg/kg, ambos por via intravenosa.

Avaliar os efeitos adversos do metamizol isolado ou coadministrado com tramadol

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Analgesia em equídeos

O reconhecimento da dor e terapia analgésica apropriada vem tornando-se cada vez mais importante na medicina veterinária (VAN DIERENDONCK et al., 2020). O tratamento da dor é importante para o bem-estar e higidez de equídeos. Atualmente a medicina veterinária dispõe de poucos medicamentos licenciados para o controle da dor para essa espécie (TAVANAEIMANESH et al., 2018).

Na Medicina Veterinária, a extrapolação empírica dos protocolos indicados para animais domésticos é uma prática rotineira, mas pode levar a falhas por desconsiderar as particularidades de cada espécie, elevando-se a possibilidade de ocorrência de subdose ou dose excessiva (FREITAS; CARREGARO, 2013).

As terapêuticas são frequentemente administradas em asininos com base na dose e nos intervalos recomendados para equinos, porque poucos fármacos têm indicações de bula específicas para asininos (GROSENBAUGH et al., 2011). No entanto, diferenças entre essas duas espécies, na distribuição de drogas, metabolismo e eliminação, foram observadas para a maioria dos agentes terapêuticos estudados.

Particularidades fisiológicas

O uso adequado de drogas para o manejo da dor pode ser alcançado com o conhecimento e a compreensão das características das espécies, e as doses dos medicamentos usados para analgesia variam dependendo do protocolo e a condição física do animal (GALATOS, 2011)

O asinino é uma espécie que apresenta fisiologia intrigante, com muitas diferenças importantes que devem ser observadas e apreciadas quando se trabalha, gerencia ou trata esses animais e atualmente não é mais aceitável simplesmente olhar o jumento e tratá-lo como um “cavalo pequeno com orelhas grandes” (GROSENBAUGH et al., 2011; BURDEN; THIEMANN, 2015).

Fisiologicamente, o asinino apresenta diferenças na temperatura corpórea, pulso e frequência cardíaca e respiratória (BURDEN; THIEMANN, 2015). Além disso, apresenta

parâmetros hematológicos diferentes ao dos equinos (MENDOZA et al., 2013; ALBERGHINA et al., 2013). Os principais são: a concentração de proteínas plasmáticas, as quais são responsáveis pelo carreamento de muitos fármacos por todo o organismo do animal e os hormônios tireoidianos, que são maiores em jumentos em comparação a equinos, e esses são responsáveis pelo aumento da atividade metabólica e assim podendo acelerar a metabolização e a excreção de fármacos.

Por serem oriundos de climas secos, como desertos e semiáridos, os asininos são capazes de controlar de maneira mais satisfatório os fluidos corpóreos. Por exemplo, é capaz de manter o volume plasmático mesmo em casos de desidratação (com perdas de 20% da quantidade de água normal do corpo) e provavelmente isso interferem na distribuição e eliminação de fármacos (Matthews; Carroll, 2007).

Portanto, é compreensível que haja diferenças na disposição dos medicamentos entre essas espécies, o que pode alterar a posologia (LIZARRAGA et al., 2004)

Os analgésicos, principalmente os não esteroidais, são um dos grupos mais estudados em asininos. No entanto, a maioria dos protocolos foi ajustada empiricamente a partir dos limitados dados farmacocinéticos disponíveis (LIZARRAGA et al., 2004; GROSENBAUGH et al., 2011).

4.2. Metamizol

O metamizol, ou dipirona, é um fármaco derivado da pirazolona que embora seja classificada como um ácido enólico, é descrita separadamente devido a sua fraca ação anti-inflamatória. (RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2009; DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ et al., 2010). É uma droga não opioide, usada em humanos e na medicina veterinária, que possui uma alta eficiência, no tratamento de febre e de dores leves a moderadas, como também na dor visceral (ZANUZZO et al., 2015; AUPANUN et al., 2016). É considerado como um inibidor fraco de ciclooxigenases (COX)-1 e COX-2, mas um forte inibidor de COX-3, além de atuar causando a supressão da síntese de prostaglandinas (FLÔR et al., 2013; KIM et al., 2018).

O controle da pirexia nos equinos ajuda a combater seus efeitos secundários, que incluem um aumento na demanda metabólica e desconforto que leva à anorexia e uma diminuição na ingestão de água (MORRESEY et al., 2019).

O metamizol é um fármaco liberado para uso em equinos, bovinos, suínos, felinos e caninos por via oral ou parenteral com doses variando de 20 a 50 mg/kg (AUPANUN et al., 2016; GIORGI et al., 2017; METZNER et al., 2020).

A baixa toxicidade, boa tolerabilidade gástrica e eficácia analgésica dão suporte ao vasto uso clínico deste fármaco. Entretanto, desde 1977 ela tem seu uso proibido pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos da América e em alguns países da Europa. Ele foi proibido em alguns países devido ao seu potencial em causar discrasias sanguíneas, principalmente em humanos, no entanto, o risco de provocar agranulocitose depende da dose, duração de utilização e associação com outros fármacos. Embora o FDA nunca tenha aprovado a dipirona para uso em espécies veterinárias, os produtos foram amplamente comercializados para uso em animais não produtores de alimentos, incluindo cavalos, a critério regulatório do FDA. No entanto, o FDA recebeu relatos de uso extra bula de dipirona em animais produtores de alimentos. Consequentemente, desde 1995, todos os produtos de dipirona para uso veterinário foram retirados do mercado até que um produto aprovado se torne disponível. O uso de dipirona em qualquer animal produtor de alimentos permanece ilegal nos Estados Unidos. (IBAÑEZ et al., 2005; DAVIS et al., 2009; JASIECKA; MASLANKA; JAROSZEWSKI, 2014; AUPANUN et al., 2016).

Dois estudos prospectivos de farmacovigilância, que duraram 12 meses, conduzidos na Polônia verificaram que o risco de efeitos adversos após administração de metamizol é muito baixo (BASAK; DROZD-SOKOLOWSKA; WIKTOR-SEDRZEJCZAK, 2010). Segundo os autores, para agranulocitose a incidência é de 0,16 casos por milhão de pessoas por ano e para os casos de anemia aplásica representam 0,08 casos por milhão de habitantes por ano. E dos cinco casos encontrados de discrasia, só 3 foram classificados por “possivelmente relacionado a terapia com metamizol”, entretanto os autores afirmam que os sujeitos que apresentaram essa alteração também faziam uso crônico de outras medicações como a carbamazepina.

Farmacocinética

Devido à restrição em muitos países, a farmacocinética da dipirona é pouco estudada (AUPANUN et al., 2016). O metamizol é rapidamente hidrolisado em quatro metabolitos. Os efeitos farmacológicos são atribuídos ao metabolito primário ativo, o 4-metilaminoantipirina

(MAA) e ao seu subproduto, 4-aminoantipirina (AA). O MAA é formado em quantidades muito maiores em comparação com outros metabólitos menores. (Kim et al., 2018). Em contrapartida, outros dois metabólitos o 4- formilaminoantipirina e o 4- acetil aminoantipirina são insignificantes do ponto de vista analgésico (EMEA- Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos, 2003)

Aupaun et al., (2016) estudando a farmacocinética de dipirona em asininos foram capazes de detectar concentrações plasmáticas de MAA a partir de 5 minutos e em até 10 horas depois da administração de metamizol por via intravenosa ou intramuscular em dose única, já o AA foi detectado entre 5 minutos e 8 horas em ambas vias de administração.

Em humanos, o efeito analgésico da dipirona está relacionado com a concentração de seus metabólitos, os quais diferem em relação ao seu tempo de surgimento (MAA > AA) e meia-vida (MAA: 4–5 horas e AA: 5-8 horas) (NIKOLOVA et al., 2012). O 4-metil-amino-antipirina é cerca de 50 vezes mais eficiente que a MT como inibidor das cicloxigenases, enquanto a AA é menos ativo que a MT. Portanto, ambos os metabólitos podem contribuir para as características clinicamente relevantes de início rápido e longa duração do efeito, permitindo intervalos de dosagem com intervalos de 8 a 10 horas.

Em humanos, mais de 90% do MT administrado é excretado na forma de metabólitos inativos pela via renal e apenas 10% é excretado na forma de MAA (NIKOLOVA et al., 2012).

Efeitos adversos

Embora MT pareça ser uma droga relativamente segura (HOFFMANN; BANTEL; JOBSKI, 2020) em comparação com outros analgésicos, há algumas evidências, que não são unanimemente aceitas, sugerindo que, após administração prolongada, o MT pode causar alguns danos ao sistema hematopoiético, desencadeando leucopenia, agranulocitose e até mesmo anemia aplásica em humanos (BASAK et al., 2010; GIORGI et al., 2015). Outro efeito adverso relatado após uso de dipirona é a idiossincrasia induzida por lesão no fígado (BJÖRNSSON, 2020)

4.3. Tramadol

O tramadol é uma droga analgésica sintética que demonstra propriedades opioides e não opioides, atuando principalmente no sistema nervoso central (VAZZANA et al., 2015). Os efeitos antinociceptivos são devidos a um mecanismo de ação duplo (opioide e não opioide). Isso se deve ao fato de o TRA atuar nos receptores μ -opioide e κ -opioide com baixa afinidade, exercendo assim um fraco efeito agonista. Além disso atua nos receptores de monoamina oxidase (MAO) bloqueando a recaptação de norepinefrina e serotonina, o que inibe a transmissão dolorosa pela medula espinal, sendo esta segunda a principal via analgésica (SOUZA; COX, 2011; READ et al., 2019).

Este fármaco é estruturalmente semelhante a morfina e a codeína, porém é 6000 vezes menos potente que a morfina e 10 vezes menos que a codeína (VAZZANA et al., 2015). Entretanto, o TRA é mais vantajoso do que outros agentes opioides típicos, devido ao seu perfil farmacológico único, uma vez que exibe menores efeitos colaterais, como depressão cardiopulmonar, quando comparado a fármacos do mesmo grupo (FLÔR et al., 2013).

A resposta analgésica do tramadol é intimamente correlacionada ao seu metabolismo, devido a diferentes atividades analgésicas de seus subprodutos. O-desmetiltramadol (M1) é relatado como sendo a principal substância ativa e é 300 vezes mais potente no receptor μ do que a molécula antes da metabolização (GIORGI et al., 2009)

Este fármaco oferece muitas vantagens como opção terapêutica; é um analgésico barato e pode ser administrado por via oral em animais de companhia (COX et al., 2010). Embora seja licenciado, e ainda sim somente em alguns países, é apenas para uso em cães e gatos (READ et al., 2019). Contudo, seu uso, experimentalmente, já foi relatado em aves, reptéis, anfíbios (SOUZA; COX, 2011) e em mamíferos como: cavalos (ABBIATI et al., 2017), chinchila (EVENSON; MANS, 2019), ovinos (BORTOLAMI et al., 2015), asininos (MARZOK; EL-KHODERY, 2015), bovinos (BANIADAM et al., 2010) e dromedários (AZARI et al., 2017).

Farmacocinética

O Tramadol está disponível numa variedade de formulações farmacêuticas para ser administrados por subcutânea, intramuscular, intravenosa, sublingual e oral (SUBEDI et al., 2019). Ele é, em sua maioria, metabolizado no fígado através das isoenzimas do citocromo P450-2D6 e P450-3A4, em O-desmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2), respectivamente, sendo os principais produtos da fase 1. Estes são ainda metabolizados em três outras substâncias secundárias, nomeadamente N-,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4), e N-,O-didesmetiltramadol (M5) (GIORGI et al., 2017).

Todos os metabolitos são conjugados com ácido glucurônico e sulfato antes da excreção pela urina (LAVASANI et al., 2013). A via de eliminação envolve quase totalmente os rins. Aproximadamente 30% da dose é excretada na urina como droga inalterada, enquanto 60% da dose é excretada como metabólitos. A droga restante é eliminada nas fezes, portanto a excreção biliar é quase insignificante (MCMILLAN et al., 2008; ABBIATI et al., 2017).

Tem sido relatado que este medicamento é metabolizado mais rapidamente em subprodutos inativos em cabras, cães e cavalos do que em gatos. A eficácia clínica do tramadol tem sido questionada em espécies que metabolizaram essa molécula principalmente em metabólitos inativos (GIORGI et al., 2009). A biodisponibilidade após administração oral de 2 mg/kg (dose preconizada em pequenos animais) em equídeos é baixa. Em equinos, foi verificada disponibilidade de apenas 3% (COX et al., 2010) e em asininos de 11% (GIORGI et al., 2009). Entretanto, quando aumentada a dose para 5 mg/kg, a biodisponibilidade, em equinos, aumentou para 64% (GIORGI et al., 2009)

Efeitos adversos

Não foram relatados efeitos colaterais do tramadol aplicados na dose de 2mg/kg por via oral em equinos. No entanto, foi relatado que agitação de curta duração, tremores, taquicardia e espasmos musculares ocorreram 15 minutos após a administração intravenosa rápida (COX et al., 2010; MOUTA et al., 2020). Giorgi et al., (2009) não observam efeitos adversos após aplicação de 2,5 mg/kg de tramadol por via intravenosa e via oral em asininos. A falta de efeitos colaterais pode ser atribuída tanto à baixa dose de droga administrada quanto ao tempo de infusão longo. A dose e a velocidade de infusão são bem conhecidas por produzir efeitos colaterais em humanos.

4.4. Interação entre fármacos

Em um protocolo de analgesia multimodal, a combinação de diversos fármacos com mecanismos de ação diferentes pode produzir efeitos aditivos ou supraditivos ao mesmo tempo em que reduz efeitos indesejados (MORENO-ROCHA et al., 2016; METZNER et al., 2020).

Em um estudo prévio, foi verificado que a coadministração de metamizol e morfina (fármaco da mesma classe do tramadol) em tratamentos agudos produzia efeitos antinoceptivos

significativamente maiores do que a morfina administrada isolada. Além de retardar o desenvolvimento de tolerância ao opioide (DOMINGUEZ-RAMIREZ et al., 2010)

A associação de metamizol e tramadol vem sendo muito utilizado no tratamento de dores moderadas a intensas em animais acometidos por neoplasias, artrites ou submetidos a cirurgia de castração (IMAGAWA et al., 2011; FLÔR et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013; MORENO-ROCHA et al., 2016). E os resultados vêm demonstrando que a associação possui efeito potencializador no tratamento de dores (MORENO-ROCHA et al., 2012).

O mecanismo farmacodinâmico para a interação entre o dipirona e o tramadol pode ser parcialmente atribuído à interação de mecanismos como a via do GMP cíclico da L-arginina-NO e a interação com os receptores do ácido N-metil D-aspartico (LÓPEZ-MUNOZ et al., 2013).

Em camundongos saudáveis e outros com artrite foram tratados com tramadol e dipirona, não se observou interação farmacocinética entre os medicamentos quando coadministrados em dose única. Enquanto, que a administração dos dois em doses repetidas, observou-se interação farmacocinética entre eles (MORENO-ROCHA et al., 2012; MORENO-ROCHA et al., 2016). Entretanto, em ambos os tratamentos houve potencialização analgésica em relação ao tratamento de qualquer uma das drogas isoladas.

5. METODOLOGIA

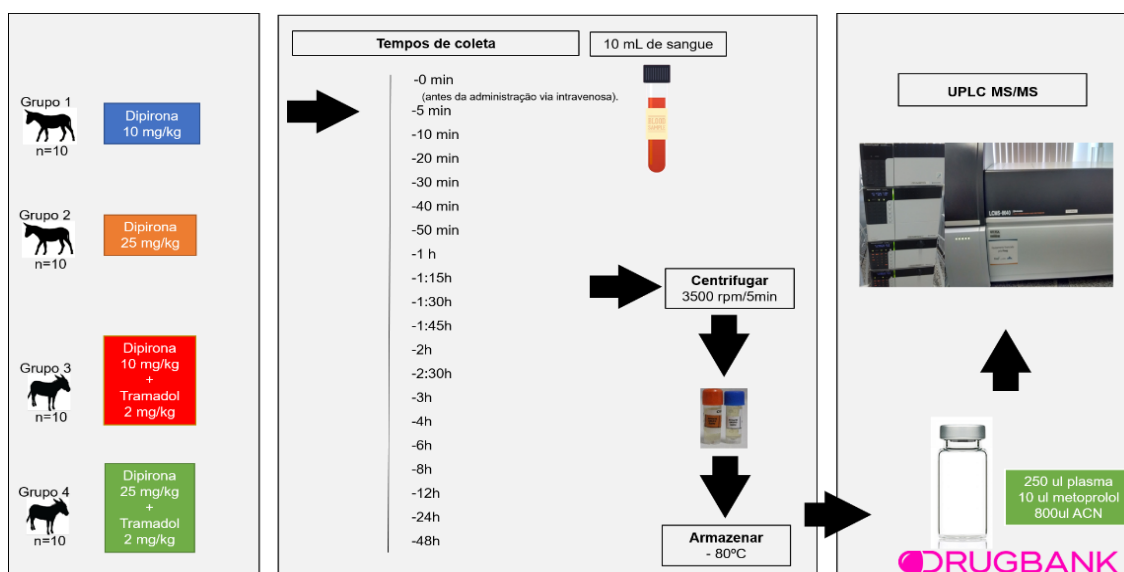
5.1. Reagentes Químicos

O analito do metamizol (pureza de 99%) foi adquirido da Farmacopeia Europeia. O restante dos analitos (MAA, AA; Tramadol e O-desmetiltramadol) foram adquiridos na Sigma-Aldrich assim como o metoprolol em pó, padrão interno. A acetonitrila grau HPLC usada na fase móvel foi comprada a J.T Baker (Fisher Scientific). As amostras sanguíneas controle foram colhidas dos asininos antes do início do experimento.

5.2. Comitê de ética e desenho experimental

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética de Uso Animal e aprovado sobre o protocolo de número (23091.006896/2019-47) e foi desenvolvido conforme organograma demonstrado abaixo.

Figura 1: Desenho experimental



Para tanto, 10 jumentos (*Equus asinus*) machos, adultos inteiros, saudáveis e pesando em média 124,80 ($\pm 13,2$ kg) oriundos da Associação de proteção animal de Apodi (Rio Grande do Norte, Brasil) foram utilizados. Apenas jumentos considerados saudáveis, confirmado por meio de exame físico (ausculta cardíaca e pulmonar, tempo de preenchimento capilar, coloração de mucosas e características fecais), hemograma (hematócrito, contagem de hemácias, teor de hemoglobina no sangue, contagem e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas), e análise de bioquímicos séricos (ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e proteínas totais).

Os animais foram desverminados com aplicação intramuscular de 0,2mg/kg de peso corporal de ivermectina (Ivomec®) e vacinados contra a raiva (Rai-vet Líquida®) quatro semanas antes do início do experimento. Eles foram abrigados em grupos de cinco animais, em estábulos sombreados medindo de 17 x 13 m. Os asininos foram alimentados com 7,5kg de gramíneas e 1,1 kg de concentrado (farelo de milho, trigo e soja, sal comum e calcário calcítico) para cada 100kg de peso corporal animal, duas vezes ao dia e acesso a água *ad libidum*. O período de aclimação, tanto do ambiente quanto do manejo foi de 4 semanas.

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 10 horas e hídrico de 6 horas antes do início da administração dos medicamentos. Para permitir tanto a administração intravenosa dos fármacos quanto a coleta de sangue, fixou-se um cateter de calibre 16G a veia jugular.

Após a coleta de sangue controle, os asininos receberam os seguintes tratamentos: No tratamento M₁₀ receberam metamizol (D500®, Zoetis, SP- Brasil) na dose de 10 mg/kg, M₂₅ – metamizol 25mg/kg e M₁₀T₂ - 10 mg/kg de metamizol associado a 2mg/kg de tramadol (Tramadon®, Cristália, SP – Brasil) e no M₂₅T₂, 25 mg/kg de metamizol com 2mg/kg de tramadol. Sendo os mesmos animais submetidos a todos os tratamentos com um intervalo entre os tratamentos de 15 dias. Todos os tratamentos administrados por via intravenosa (2 minutos para aplicação do medicamento). Após a aplicação dos fármacos, amostras de 10 ml sangue foram coletadas em horários predefinidos conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Cronograma das coletas de sangue dos asininos após administração de metamizol e tramadol por via intravenosa

TEMPO									
0:00'	0:05'	0:10'	0:20'	0:30'	0:40'	0:50'	1:00h	1:15 h	1:30h
1:45h	2:00h	2:30h	3:00h	4:00h	6:00h	8:00h	12:00h	24:00h	48:00h

O sangue foi acondicionado em tubos de vidro contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Em seguida, centrifugados por 10 minutos a 1750g para retirada do plasma sanguíneo os quais foram realocados em criotubos de 2 ml e armazenados em freezer a -80°C até o momento da análise.

5.3. Extração das amostras

A 250 µl de plasma enriquecido com solução estoque (amostras de curvas, controle de qualidade e amostra do sujeito), foram adicionados 10 µl de metoprolol 0,1 mg / mL (padrão interno) e 800 µl de acetonitrila (JT Baker / Fisher Scientific® Phillipsburg, Novo Jersey, EUA). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por vórtice por 60 segundos, após os quais as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13350g, e uma alíquota de 5,0 µL da solução foi injetada no sistema LC-MS / MS para análise.

5.4. Condições analíticas (LC-MS/MS)

A análise cromatográfica foi realizada no sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (UPLC-MS/MS), constituído por um aparelho Nexera-x2 UPLC acoplado a um detector de espectrometria de massa LCMS-8040 (Shimadzu, Japan), usando uma coluna Shimadzu UPLC BEH C18 (dimensões 1,7 µm, 2,1 × 75 mm) (Shimadzu, Japan). A fase móvel utilizada foi uma solução composta acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,1% na proporção de 75:25, com fluxo de 0,3 mL/min. O tempo de corrida estabelecido foi de dois minutos e o volume de amostra injetado de 5,0 µL. A temperatura da coluna ajustada para 40 °C e o refrigerador do amostrador automático regulado para 5 °C.

Para Tramadol, M1, MAA e AA, o espectrômetro de massa foi ajustado no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) no modo de Ionização por electropulverização (ESI) positivo. A energia de colisão e a tensão do cone foram 12 e 19 V, respectivamente. A taxa de fluxo do gás cone e dessolvatação será ajustada para 150 e 600 L/min, respectivamente, usando argônio como gás de colisão na vazão de 0,15 mL/min. O espectrômetro de massa foi

ajustado para captar a transição da faixa do íon principal para o íon filho conforme demonstrado na tabela 2. Dados de MRM foram adquiridos, analisados e otimizados por meio do software Labsolution (Shimadzu, Japan).

Tabela 2: Relação massa e carga (m/z) dos íons principais e íons filhos do tramadol, O-desmetiltramadol (M1), 4-metilaminoantipirina (MAA), 4-aminoantipirina (AA) e metoprolol (Padrão interno).

Analito	Íon principal (m/z)	Íon Filho (m/z)
Tramadol	264,00	58,00
O-desmetiltramadol	250,00	58,00
4-metilaminoantipirina	218,20	159,10
4-aminoantipirina	204,20	76,90
Metoprolol	268,10	131,1

5.5. Validação

O método analítico foi validado de acordo com os critérios estabelecidos pelo International Conference on Harmonisation (ICH E6 (R2) - 2016) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166-2017. Plasmas brancos (livre de medicamentos) foram enriquecidos com solução de padrões para obter uma curva de calibração (Linearidade). Da mesma forma, amostras de controle de qualidade foram preparadas em concentrações baixas, médias e altas (Tabela 3), e estas foram utilizadas para determinar a recuperação absoluta e precisão de precisão intra e inter-dia. A seletividade foi avaliada preparando o limite inferior de quantificação (LLOQ) no plasma livre de drogas. Estabilidade (matriz biológica a -70 °C), temperatura de bancada à temperatura ambiente (20 °C), 3 ciclos de congelamento e descongelamento e amostras processadas no amostrador automático também foram avaliadas.

Tabela 3: Faixa de trabalho das curvas de calibração e concentração dos pontos controles para validação dos métodos analíticos

Analito	Faixa de trabalho (ng/mL)	Pontos controles (ng/mL)		
		Baixa	Média	Alta
Tramadol	5 – 5000	15	1000	3750
O-desmetiltramadol	5 – 5000	15	1000	3750
4-metilaminoantipirina	800 – 40000	2400	12000	30400
4-aminoantipirina	800 – 40000	2400	12000	30400
metoprolol	1000	NA		

Legenda: NA – Não se aplica

5.6. Análise farmacocinética e estatística

Parâmetros farmacocinéticos para os fármacos e seus metabólitos foram calculados usando modelos não compartimentais com o software WinNonlin 6.2.1 (Pharsight, Mountain View CA, EUA, 2011). As variáveis calculadas foram: a concentração plasmática máxima ($C_{\max}$), o tempo para atingir a $C_{\max}$ ($T_{\max}$), a área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero até ao momento da última concentração mensurável ($AUC_{0 \rightarrow t}$) e a extrapolação da AUC até ao infinito ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$), volume de distribuição aparente (V_z/F), depuração aparente (CL/F), meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$); Tempo médio residual até o momento da última mensuração ($MRT_{0 \rightarrow t}$), Tempo médio residual do momento zero até o infinito ($MRT_{0 \rightarrow \infty}$).

5.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá). A normalidade de todos os parâmetros foi analisada pelo teste de Shapiro Wilk. Com exceção do $T_{\max}$ que foi avaliado pelo teste de Mann Whitney e expresso em mediana, todos os demais parâmetros

foram comparados pelo teste T e expressos em média e desvio padrão. Uma diferença significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

6. REFERÊNCIAS

ABBIATI, R. A. et al. A physiologically based model for tramadol pharmacokinetics in horses. **Journal of theoretical biology**, v. 429, p. 46-51, 2017.

ALBERGHINA, D. et al. Reference intervals of serum protein concentrations from clinically healthy female Ragusana donkeys (*Equus asinus*) determined by cellulose acetate electrophoresis. **Journal of equine veterinary science**, v. 33, n. 6, p. 433-436, 2013.

AUPANUN, S. et al. pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-methyl-amino-antipyrine and 4-acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (dipyrone) in Healthy Donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 47, p. 55-61, 2016.

AZARI, O. et al. Analgesic and sedative effects of caudal epidural tramadol in dromedary camels. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n. 1, 2019.

BANIADAM, A; AFSHAR, F. S.; AHMADIAN, F. Analgesic effects of tramadol hydrochloride administered via caudal epidural injection in healthy adult cattle. **American journal of veterinary research**, v. 71, n. 7, p. 720-725, 2010.

BASAK, G. W.; DROZD-SOKOŁOWSKA, J.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. Update on the incidence of metamizole sodium-induced blood dyscrasias in Poland. **Journal of International Medical Research**, v. 38, n. 4, p. 1374-1380, 2010.

BJÖRNSSON, E. S. Liver injury associated with the analgetic drug metamizole. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2020.

BORTOLAMI, E. et al. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 3, p. 404-409, 2015.

BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys are different. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 376-382, 2015.

CAGNARDI, P. et al. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. **Research in veterinary science**, v. 90, n. 3, p. 503-509, 2011.

Committee for Veterinary Medicinal Products. (2003) EMEA/MRL/878/ 03-FINAL

COOK, V. L.; BLIKSLAGER, A.T. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in critically ill horses. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 76-88, 2015.

COX, S.; VILLARINO, N.; DOHERTY, T. Determination of oral tramadol pharmacokinetics in horses. **Research in veterinary science**, v. 89, n. 2, p. 236-241, 2010.

DAI, F. et al. Welfare conditions of donkeys in Europe: initial outcomes from On-farm assessment. **Animals**, v. 6, n. 1, p. 5, 2016.

DAVIS, J.L. et al. Update on drugs prohibited from extralabel use in food animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 5, p. 528-534, 2009.

DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A.M. et al. Effect of metamizol on morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and subchronic administration in arthritic rats. **European journal of pharmacology**, v. 645, n. 1-3, p. 94-101, 2010.

EVENSON, E.; MANS, C. Antinociceptive efficacy and safety of subcutaneous tramadol in chinchillas (*chinchilla lanigera*). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 28, p. 98-104, 2019.

FLÔR, P.B. et al. Tramadol plus metamizole combined or not with anti-inflammatory drugs is clinically effective for moderate to severe chronic pain treatment in cancer patients. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 40, n. 3, p. 316-327, 2013.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B.. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GALATOS, A.D. Anesthesia and analgesia in sheep and goats. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 47-59, 2011.

GIORGI, M. et al. Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. **Small Ruminant Research**, v. 132, p. 143-146, 2015.

GIORGI, M. et al. Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites in healthy horses. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 165-171, 2017.

GIORGI, M. et al. Pharmacokinetics of tramadol and its metabolites M1, M2, and M5 in donkeys after intravenous and oral immediate release single-dose administration. **Journal of equine veterinary science**, v. 29, n. 7, p. 569-574, 2009.

GROSENBAUGH, D. A.; REINEMEYER, C. R.; FIGUEIREDO, M. D. Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, v. 23, n. 10, p. 523-530, 2011.

HEDENMALM, Karin; SPIGSET, Olav. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). **European journal of clinical pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 265-274, 2002.

HOFFMANN, F.; BANTELE, C.; JOBSKI, K.. Agranulocytosis attributed to metamizole: An analysis of spontaneous reports in EudraVigilance 1985-2017. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 126, n. 2, p. 116-125, 2020.

IBAÑEZ, L. et al. Agranulocytosis associated with dipyrone (metamizol). **European journal of clinical pharmacology**, v. 60, n. 11, p. 821-829, 2005.

IMAGAWA, V.H. et al. The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 38, n. 4, p. 385-393, 2011.

JASIECKA, A.; MAŚLANKA, T.; JAROSZEWSKI, J. J. Pharmacological characteristics of metamizole. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 17, n. 1, p. 207-214, 2014.

KIM, T. W. et al. Pharmacokinetic profiles of metamizole (dipyrone) active metabolites in goats and its residues in milk. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 41, n. 5, p. 699-705, 2018.

LAVASANI, H. et al. Study of the pharmacokinetic changes of Tramadol in diabetic rats. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 17, 2013.

LIZARRAGA, I.; SUMANO, H.; BRUMBAUGH, G. W. Pharmacological and pharmacokinetic differences between donkeys and horses. **Equine Veterinary Education**, v. 16, n. 2, p. 102-112, 2004.

LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. et al. Enhancement of antinociception but not constipation by combinations containing tramadol and metamizole in arthritic rats. **Archives of medical research**, v. 44, n. 7, p. 495-503, 2013.

MARZOK, M.A.; EL-KHODERY, S.A. Comparative analgesic and sedative effects of tramadol, tramadol-lidocaine and lidocaine for caudal epidural analgesia in donkeys (*Equus asinus*). **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 42, n. 2, p. 215-219, 2015.

MATTHEWS, N.S., CARROLL, G.L. Review of equine analgesics and pain management. In **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Orlando, Florida (pp. 240-4), 2007.

MATTHEWS, N.; VAN LOON, J. P.A. M. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. **Equine Veterinary Education**, v. 25, n. 1, p. 47-51, 2013.

MCMILLAN, C.J. et al. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 4, p. 325-331, 2008.

MENDOZA, F.J. et al. Thyroid hormone concentrations differ between donkeys and horses. **Equine veterinary journal**, v. 45, n. 2, p. 214-218, 2013.

METZNER, M. et al. Use of metamizole as an additional analgesic during umbilical surgery in calves. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, 2020.

MOUTA, A. N. et al. Pharmacokinetic properties of tramadol and M1 metabolite in Northeast Brazilian donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 2020.

MORENO-ROCHA, L. A. et al. Antinociceptive effects of tramadol in co-administration with metamizol after single and repeated administrations in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 1, p. 1-5, 2012.

MORENO-ROCHA, L. A. et al. Effect of tramadol on metamizol pharmacokinetics and pharmacodynamics after single and repeated administrations in arthritic rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 6, p. 674-684, 2016.

MORRESEY, P.R. et al. Randomized blinded controlled trial of dipyron as a treatment for pyrexia in horses. **American journal of veterinary research**, v. 80, n. 3, p. 294-299, 2019.

NIKOLOVA, I et al. Metamizole: a review profile of a well-known “forgotten” drug. part I: pharmaceutical and nonclinical profile. **Biotechnology& Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 6, p. 3329-3337, 2012.

READ, K; KHATUN, M; MURPHY, H. Comparison of transdermal fentanyl and oral tramadol for lateral thoracotomy in dogs: cardiovascular and behavioural data. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 46, n. 1, p. 116-125, 2019.

REGAN, F.H. et al. Behavioural repertoire of working donkeys and consistency of behaviour over time, as a preliminary step towards identifying pain-related behaviours. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101877, 2014.

RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J.; FLORES-MURRIETA, F. J. Synergistic interaction between tramadol and dipyron in thermal paw stimulation model in the rat. **Drug Development Research**, v. 70, n. 6, p. 450-454, 2009.

SHEIKHOLESLAMI, B. et al. Evaluation of the route dependency of the pharmacokinetics and neuro-pharmacokinetics of tramadol and its main metabolites in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 55-63, 2016.

SOUZA, M.J.; COX, S. K. Tramadol use in zoologic medicine. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 117-130, 2011.

SUBEDI, M et al. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 443-451, 2019.

TAVANAEIMANESH, H et al. Comparison of Analgesic Effects of a Constant Rate Infusion of Both Tramadol and Acetaminophen Versus those of Infusions of Each Individual Drug in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 64, p. 101-106, 2018.

UDEGBUNAM, R. I. et al. Effects of two doses of tramadol on pain and some biochemical parameters in rabbits post-gastrotomy. **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, n. 4, p. 783-790, 2015.

VAN DIERENDONCK, M. C. et al. Monitoring Acute Pain in Donkeys with the Equine Utrecht University Scale for Donkeys Composite Pain Assessment (EQUUS-DONKEY-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Donkey Facial Assessment of Pain (EQUUS-DONKEY-FAP). **Animals**, v. 10, n. 2, p. 354, 2020.

VAZZANA, M. et al. Tramadol hydrochloride: pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 70, p. 234-238, 2015.

ZANUZZO, F.S. et al. Analgesic and antihyperalgesic effects of dipyrone, meloxicam or a dipyrone–meloxicam combination in bitches undergoing ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 1, p. 33-37, 2015.

ZARO, D et al. Pythiuminsidiosum em equino: Relato de caso. **PUBVET**, v. 12, p. 136, 2018.

Capítulo 1: Artigo Farmacocinética da Dipirona

Artigo submetido à:

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics

**Pharmacokinetic properties of active metabolites of metamizole in
Northeastern Brazilian donkeys (*Equus asinus*)**

Running title: Pharmacokinetics of MT metabolites in donkeys

Luã Barbalho de Macêdo¹; Andressa Nunes Mouta¹; Gabriel Araújo-Silva²; José Pérez-Urizar³;
Valéria Veras de Paula¹

¹ Universidade Federal Rural do Semi Árido, Mossoró- RN, Brazil.

² Universidade do Estado do Amapá, Macapá - AP, Brazil.

³ Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí - SLP, Mexico.

Correspondence: Valéria Veras de Paula, Department of Animal Science, Universidade Federal
Rural do Semi Árido, Pres. Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900, Brazil. E-mail:
valeria@ufersa.edu.br

ORCID

Luã Barbalho de Macêdo: <https://orcid.org/0000-0002-8274-8797>

Andressa Nunes Mouta: <https://orcid.org/0000-0003-0319-2696>

Valéria Veras de Paula: <https://orcid.org/0000-0003-4292-4861>

José Trinidad Pérez Urizar: <https://orcid.org/0000-0003-0642-0033>

Gabriel Araujo-Silva: <https://orcid.org/0000-0002-9073-1995>

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was carried out with the financial support of CAPES, Coordination for the improvement of higher education personnel - Brazil, within the scope of the General Program of International Cooperation –AUX 395/2018 PGCI.

Abstract

Metamizole (MT) is an analgesic and antipyretic drug labeled for use in humans and domestic animals in some countries. As with most drugs, the administration of MT to donkeys is based on studies carried out with horses. In the present study, we aimed to determine the pharmacokinetics of two of the main active metabolites (N-methyl-4-aminoantipyrine (MAA) and 4-aminoantipyrine (AA)) of MT after administering 10 (M₁₀) and 25 mg/kg (M₂₅) IV doses to Northeastern Brazilian donkeys (*Equus asinus*; n = 10). Blood was collected at predetermined times over 48 h, and MAA and AA plasma concentrations were determined using a validated liquid chromatography-mass spectrometry method. The metabolites were quantifiable in M₁₀ until 12 h and M₂₅ until 24 h after MT administration. As expected, AUC_{0→t}, AUC_{0→∞}, and C_{max} demonstrated significant increases in MT metabolites when the groups were compared. No adverse effects were observed. This study indicates the need for an extremely sensitive analytical method to adequately characterize the pharmacokinetics of active metabolites of MT, MAA and AA. Clinical studies are required to determine the implications of these observations regarding the pharmacodynamic response to MT in Northeastern Brazilian donkeys.

Keywords: N-methyl-4-aminoantipyrine, 4-aminoantipyrine, pharmacokinetics, non-opioid analgesic.

1 INTRODUCTION

Donkeys are domestic animals that have a limited economic impact on major pharmaceutical markets compared to horses. However, drugs are frequently administered to donkeys based on the dosage and intervals recommended for horses. The differences between these species with regard to the distribution, metabolism, and elimination of drugs have been observed for most studied therapeutic agents (Burden & Thiemann, 2015). There have been few drug pharmacokinetics studies or specific indications for donkeys (Grosenbaugh et al., 2011; Matthews & Van Loon, 2019; Mouta et al., 2020). Therefore, additional pharmacokinetic studies should be conducted.

There is a lack of information on the use of analgesics for pain management in donkeys, but there is some evidence that opioids may effectively control some types of pain in donkeys (Matthews and Van Loon, 2019). There is also some information on tramadol pharmacokinetics in the Northeastern Brazilian donkey (Mouta et al., 2020). However, information specific to analgesia and the pharmacokinetics of non-opioid drugs in donkeys is greatly needed.

Metamizole (MT), a non-opioid prodrug, is labeled for pain treatment in horses, humans, and other domestic animals. It is efficient in fever control and mild to moderate pain treatment (Zanuzzo et al., 2015; Aupanun et al., 2016). When applied intravenously, MT is rapidly hydrolyzed to its main active metabolite, 4-methylaminoantipyrine (MAA). When it reaches the liver, MT is metabolized to 4-aminoantipyrine (AA) by demethylation. In addition, other less active or inactive metabolites (*N*-formyl-4-aminoantipyrine and *N*-acetyl-4-aminoantipyrine) of MT are formed at low concentrations (Domínguez-Ramírez et al., 2012; Rogosch et al., 2012).

The use of MT has grown in veterinary medicine over the last decade due to its analgesic potency, safety, and low cost (Giorgi et al., 2018). Although MT is labeled for use in humans, canines, pigs, cattle, and horses (Giorgi et al., 2017), its use is prohibited in the United States,

Denmark, India, Sweden, Iran, Japan, and the United Kingdom (Basak et al., 2010) because it has been shown to cause idiosyncratic bone marrow degeneration in humans. Therefore, the ban was extended to all animals that serve as food for the population in these countries (Jasiecka et al., 2014; Morrese et al., 2019).

Despite the ban on its use in some countries, several studies on this substance and its metabolites have used piglets (Burmańczuk et al., 2016), dogs (Giorgi et al., 2018), cats (Lebkowska-Wieruszewska et al., 2017), goats (Kim et al., 2018), and horses (Giorgi et al., 2017). To the best of our knowledge, there has only been one pharmacokinetic study on asinine species. This study used females of the Mammoth Jackstock breed (Aupanun et al., 2016) and only one dose (25 mg/kg). Therefore, in the present study, we aimed to compare the pharmacokinetic profiles of MT metabolites when two dose rates were administered intravenously to male donkeys from a Northeastern Brazilian breed using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS).

2 MATERIALS AND METHODS

1. 2.1 Animals

The study was approved by the Institutional Animal Use Ethics Committee (23091.006896/ 2019–47). Ten adult male Northeastern Brazilian donkeys from the Apodi Animal Protection Association with an average weight of 124.80 ± 13.2 kg were used. Only healthy donkeys were included in the study. Their health was confirmed by clinical examination, blood counts, and serum biochemical analysis (urea, creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and total proteins).

2.2 Experimental design

One day before the procedure, the animals were transferred to individual stalls where food and water were withheld for 10 and 6 h, respectively. The animals were subjected to two treatments (M₁₀ and M₂₅) with an interval of 15 days in a non-randomized parallel design. In M₁₀, 10 animals received 10 mg/kg MT (D-500 Dipirona®; Zoetis, São Paulo, Brazil) and in M₂₅, the same 10 animals received 25 mg/kg, all through a single administration of 15 mL of 0.9% NaCl solution administered intravenously (IV). The animals were evaluated for adverse effects, such as ataxia, restlessness, salivation, sweating, and muscle spasms.

The infusions for the IV administration of MT and the collection of blood samples were always performed by the same person. Previously, the skin was cleaned and a 16G-caliber catheter coupled to a 3-way tap was fixed to the jugular vein of the animals using an infusion bomb (Santronic®, São Paulo, Brazil). The drug was administered over 2 minutes.

Blood samples (10 mL) were collected at the following times: 0 (before drug administration) and 0.08, 0.16, 0.33, 0.5, 0.75, 0.83, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, and 48 h after drug administration. The blood was collected from each animal, placed in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulant (EDTA), and centrifuged at 1,715 *g* for 10 min to obtain the plasma. The plasma samples were stored at –80°C in cryogenic tubes until analysis.

2.3 Sample extraction procedure

The samples were prepared by combining 250 µL of plasma spiked with stock solution (curve samples, quality control, and subject sample) containing 10 µL of 0.1 mg/mL metoprolol (internal standard) and 800 µL of acetonitrile. Then, the samples were homogenized by vortexing for 60 s, after which the samples were centrifuged for 5 min at 13,550 *g* and a 5.0 µL aliquot of the solution was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

2.4 Instrumentation

An analytical method was developed for the determination of MAA and AA. The method included positive electrospray ionization ESI (+) using a UPLC-MS/MS system consisting of a Nexera 2 UPLC (Shimadzu) coupled to an LCMS-8040 mass spectrometer (Shimadzu) and a BEH C18 column (1.7 μm , 2.1 $\times$ 75 mm) (Waters, USA).

2.5 LC and MS conditions

Acetonitrile and a 0.1% formic acid solution (75:25, v/v) were used as the mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. The running time was 2.0 min, and the injected sample volume was 5.0 μL . The column temperature was set to 40°C and the autosampler cooler was set to 5°C. For MAA and AA, the mass spectrometer was adjusted to multiple reaction monitoring (MRM) in the ESI positive ionization mode. The collision energy and cone voltage were 12 and 19 V, respectively. The cone gas flow rate and desolvation were calibrated to 150 and 600 L/min, respectively, using argon as the collision gas at a flow rate of 0.15 mL/min.

The tandem mass spectrometer was tuned to monitor m/z 218.0 $\rightarrow$ m/z 159.1, 204.0 $\rightarrow$ 76.9, and 268.1 $\rightarrow$ 131.1 transitions for MAA; AA, and metoprolol, respectively, with a dwell time of 30 ms. The MRM data were acquired and analyzed using Labsolution software (Shimadzu).

2.6 Method validation

The analytical protocol was developed and validated according to the criteria required by the International Conference on Harmonization (ICH E6 (R2) - 2016) and by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) in the Resolution of the Collegiate Board (RDC) 166–2017. The following factors were evaluated: linearity (800–40000 ng/mL), repeatability, reproducibility, and selectivity in solution and in plasma, stability by short- and

long-term methods, freezing and thawing cycles with lower and upper limit control samples, and controls in low, medium, and high concentrations (2400, 12000, and 30400 ng/mL, respectively). Drug-free plasma was spiked with drug standard solutions to obtain a calibration curve. Similarly, quality control samples (QC) were prepared. These QC samples were also used to determine absolute recovery, accuracy, and intra- and inter-day precision. Selectivity was assessed by preparing the lower limit of quantitation (LLOQ; 84 ng/mL) in drug-free plasma. Stability (long-term in biological matrix at -70°C ; bench temperature at room temperature (20°C); three freeze-thaw cycles and samples processed in the automatic sampler) was also evaluated.

2.7 Pharmacokinetic and statistical analyses

The pharmacokinetic profiles were analyzed using a non-compartmental model and with the aid of WinNonlin 6.2.1 software (Pharsight, Mountain View CA, USA, 2011). The following variables were observed: the plasma concentration at time zero (C_0), the area under the plasma concentration curve from time zero to the moment of the last measurable concentration ($\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$), the extrapolation of the AUC to infinity ($\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$), elimination rate constant (K_e), half-life ($T_{1/2}$), mean residual time until the last measurement ($\text{MRT}_{0 \rightarrow t}$), and mean residual time from moment zero to infinity ($\text{MRT}_{0 \rightarrow \infty}$).

The statistical analyses were performed using BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá). The normality of the parameters was analyzed using the Shapiro Wilk test, except for $T_{\max}$, which was evaluated by the Mann Whitney test and expressed as a median. All other parameters were compared using a t test and expressed as the mean and standard deviation. A P-value less than 0.05 was considered as statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Analytical methods

The LC-MS/MS method was validated using donkey plasma and was found to be sensitive and selective. No matrix effect was observed because the coefficient of variation was below 15% when the areas were compared with and without a biological matrix. MAA and AA were linear ($R^2 > 0.99$) in the range 80–40,000 ng/mL. The samples were re-analyzed after dilution in white plasma when the samples exceeded the upper limit of the range. Repeatability (intra-day precision) was measured as a coefficient of variation between assays while reproducibility (inter-day precision) was measured as proximity to the concentration added in the same repetitions, and all relative coefficients of variation were less than 5%. Accuracy, measured as the % error, was lower than $\pm 10\%$ for both the MAA and AA measurements. Short-term stability evaluation suggested that MAA and AA were stable in plasma at room temperature (20°C) for 2 h, after three freeze-thaw cycles, and after processing the samples at the autosampler temperature (4°C) for 24 h. Long-term stability assessment showed that MAA and AA in plasma were stable for a period of 28 weeks. The LLOQ was determined for all the analytical curves with a variation of less than 20%.

3.2 Pharmacokinetic analysis

The plasma levels of MAA and AA were detectable up to 24 h after intravenous administration of both doses in some of the animals. However, all quantifiable samples were available in all animals from the 8 h sample after the 10 mg/kg treatment and 12 h sample after the 25 mg/kg treatment. The pharmacokinetic profile of MAA is shown in Figure 1. Although the MAA plasma levels increased as the dose increased, they were three times higher when the dose was increased from 10 to 25 mg/kg. This was less evident for AA (Figure 2) because the mean time course of the plasma levels of the metabolite formed only increased 1.5 times after the higher dose was administered.

The pharmacokinetic model that best suited the results was the non-compartmental model. In the M₁₀ treatment, the K_e value for the MAA metabolite was significantly higher than

that for the M₂₅. The 25 mg/kg dose showed significantly higher C₀, AUC_{0→t}, AUC_{0→∞}, MRT_{0→t}, and T_{1/2} values for MAA (Table 1) and C₀, AUC_{0→t}, and AUC_{0→∞} for AA (Table 2). No adverse effects were observed during the experiment.

4 DISCUSSION

This is the first pharmacokinetic study of MT using chromatography analysis coupled with a mass spectrometer in donkeys. The recommended dose for MT in the species ranges from 20 to 50 mg/kg, with 25 mg/kg being commonly used in equines (Aupanun et al., 2016; Lebrowska-Wieruszewska et al., 2017; Kim et al., 2018; Morresey et al., 2019). However, the European Medicines Evaluation Agency (EMA, 2003) reported that in two studies carried out on mice using 0, 1, 5, 10, 100, and 250 mg/kg, the dose of 10 mg/kg was the highest at which no adverse effects, such as sialorrhea, tremors, depression of respiration, and sedation, were observed. In addition, Imagawa et al. (2011), who studied the analgesic effects of different doses of MT in dogs, observed that the administration of 25 mg/kg and 35 mg/kg produced the equivalent postoperative analgesia. Thus, we chose to evaluate the pharmacokinetic profiles of dose of 10 mg/kg in these animals because the majority of studies regarding pain and analgesia in donkeys (Oliveira et al., 2020) and horses (Taffarel et al., 2015) used MT at 10 mg/kg and 25 mg/kg as they are usually the recommended doses.

In a biological environment, MT is a prodrug that undergoes hydrolysis via a non-enzymatic mechanism that generates MAA (Levy et al., 1995). The parent drug is detectable in the serum a few minutes after intravenous administration and is not detectable after oral administration. It is also not detectable in urine (Vlahov et al., 1990). MT was detectable only in the first samples by MRM mode in ESI negative ionization mode, but due to the lack of clinical relevance and fast degradation, the metabolism of MT was not quantified. Its metabolites, MAA and AA, are used in pharmacokinetic studies of this drug because they are considered capable of inhibiting cyclooxygenases (Kim et al., 2018). The rapid conversion of

MT to MAA and AA was demonstrated in this study because the T_{max} values showed no statistical differences between groups.

The pharmacokinetic parameters C_{max} , $AUC_{0 \rightarrow t}$, and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ are dose dependent. However, doubling the dose does not double the values of these parameters (Lin, 1994; Chen et al., 2018). In the present study, the doses differed by a factor of 2.5 times, resulting in a significant increase in the parameters of the two metabolites in the animals that received 25 mg/kg, which were 3-fold more for the MAA and 2-fold more for the AA C_{max} and bioavailability ($AUC_{0 \rightarrow t}$ and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$) values. Significant differences in K_e and mean residual times ($MRT_{0 \rightarrow t}$ and $MRT_{0 \rightarrow \infty}$) were observed only for MAA. Therefore, it is possible to infer that there was no saturation of the AA metabolite connections with the plasma carrier proteins, and there was a similar distribution between the two treatments. In addition, their elimination via urine and feces was not impaired. This means that the organism is able to biotransform the AA through the liver and excrete it through the kidneys and feces, without damage, at both doses of 10 and 25 mg/kg and thus does not saturate the body enzymes. In addition, we suggest that approximately 20% MAA was also oxidized to FAA by a non-enzymatic reaction, as suggested in humans. MAA is the main metabolite responsible for analgesia and presents a different elimination profile when comparing the doses. This was shown by the increase in $T_{1/2}$ in the M_{25} group (Rogosch et al., 2012).

The half-lives of MAA and AA observed in the M_{25} group were similar to that observed in horses (3.34 and 6.43 h, respectively) (Giorgi et al., 2017), and in sheep (3.01 h for MAA) (Giorgi et al., 2015). However, it was higher than that observed in female mammoth jackstock donkeys (1.81 h and 3.87 h, respectively) (Aupunun et al., 2016) and goats (0.72 h and 3.91 h, respectively) (Kim et al., 2018), and lower than that observed in cats (6.36 h and 27.50 h, respectively) (Lebkowska-Wieruszewska et al., 2017). The reason for this difference can be explained by several factors, such as pharmacogenetic variations and the enzymatic expression

that influences the metabolism of the species or breed, the physical and health condition of the animal, or the sensitivity and selectivity of the method used to quantify the metabolites (Campion & Dowell, 2019; Mealey, 2019). The 25 mg/kg dose was found to be safe in mammoth jackstock donkeys (Aupunun et al., 2016), and other studies demonstrated that a dose of 25 mg/kg in horses (Giorgi et al., 2017) and dogs (Giorgi et al., 2018), was also safe. However, episodes of vomiting and salivation have been reported in cats (Lebkwska-Wieruszewska et al., 2017), probably because this species has a deficiency in drug metabolism due to reduced amounts of phase II enzymes. In the present study, no adverse effects were observed at either dose (10 or 25 mg/kg).

According to pharmacokinetic assays, compared to the inhibition of cyclooxinases, MAA and AA have been shown to inhibit human COX-1 and COX-2 in vitro (Hinz et al., 2007). If these minimal effective concentrations (MECs) apply to Northeastern Brazilian donkeys, the plasma concentration of MAA, but not AA, was above the COX-1 and COX2 relevant IC₅₀ values for a range of correlated doses (Figure 3). Hence, MAA may generate a therapeutic effect in the donkeys by COX-2 and COX 1 inhibition. Although it is known that MT inhibits COX3, its mechanism will need to be elucidated to better understand the role of MAA and AA in inhibiting this enzyme. In conclusion, the reduced MEC time in the M₁₀ group suggests that this dose may be used in the donkey at 6 h intervals, whereas the interval should be 12 h in the M₂₅ group. This study indicates the need for an extremely sensitive analytical method to adequately characterize the pharmacokinetics of active metabolites of MT, MAA and AA. Clinical studies are required to determine the implications of these observations regarding the pharmacodynamic response to MT in Northeastern Brazilian donkeys.

FUNDING

The present work was carried out with the financial support of CAPES, Coordination for the improvement of higher education personnel - Brazil, within the scope of the General Program of International Cooperation –AUX 395/2018 PGCI.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ANIMAL WELFARE AND ETHICS STATEMENT

The study was approved by the Institutional Animal Use Ethics Committee (23091.006896/2019–47).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Luã Barbalho de Macêdo: acquisition of data and interpretation; involved in drafting the manuscript and reviewing; **Andressa Nunes Mouta:** data acquisition; **Gabriel Araújo da Silva:** contributions to conception and design, data analysis and interpretation; involved in drafting the manuscript and reviewing; **José Pérez Urizar:** contributions to conception and design, data analysis and interpretation; **Valéria Veras de Paula:** contributions to conception and design, data analysis and interpretation; involved in drafting the manuscript and reviewing.

REFERENCES

- 282 ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria
283 Colegiada-RDC Nº 166. 2017. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/>
- 284 Aupanun, S., Laus, F., Poapolathep, A., Owen, H., Vullo, C., Faillace, V., & Giorgi, M. (2016).
285 Pharmacokinetic assessment of the marker active metabolites 4-Methyl-amino-antipyrine
286 and 4-Acetyl-amino-antipyrine after intravenous and intramuscular injection of
287 metamizole (Dipyrone) in healthy donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 47, 55-
288 61. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.005>.
- 289 Basak, G. W., Drozd-Sokołowska, J., & Wiktor-Jedrzejczak, W. (2010). Update on the
290 incidence of metamizole sodium-induced blood dyscrasias in Poland. *Journal of*
291 *International Medical Research*, 38(4), 1374–1380.
292 <https://doi.org/10.1177/147323001003800419>
- 293 Burden, F., & Thiemann, A. (2015). Donkeys are different. *Journal of Equine Veterinary*
294 *Science*, 35(5), 376–382. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.03.005>
- 295 Burmańczuk, A., Milczak, A., Grabowski, T., Osypiuk, M., & Kowalski, C. (2016). The
296 using of a piglets as a model for evaluating the dipyrone hematological effects. *BMC Veterinary*
297 *Research*, 12(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0891-5>
- 298 Champion, D. P. & Dowell, F. J. (2019). Translating pharmacogenetics and
299 pharmacogenomics to the clinic: progress in human and veterinary medicine. *Frontiers in*
300 *Veterinary Science*, 6(22). <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00022>
- 301 Chen, Q., Hu, C., Liu, Y., Song, R., Zhu, W., Zhao, H., & Liu, Y. (2018).
302 Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of single-dose denosumab in
303 healthy Chinese volunteers: A randomized, single-blind, placebo-controlled study. *PloS One*,
304 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197984>

The European Agency for the evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicine and Inspections. Committee for Veterinary Medicinal Products. (2003). Available in: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/metamizole-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf.

Domínguez-Ramírez, A. M., Calzadilla, P. C., Cortés-Arroyo, A. R., y de la Peña, M. H., López, J. R. M., Gómez-Hernández, M., & López-Muñoz, F. J. (2012). High-performance liquid chromatographic assay for metamizol metabolites in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.07.029>

Giorgi, M., Łebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Owen, H., Poapolathep, A., Kim, T. W., & De Vito, V. (2018). Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites after four different routes of administration in healthy dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(3), 42–436. <https://doi.org/10.1111/jvp.12484>

Giorgi, M., De Vito, V., Lee, H. K., Laus, F., Kowalski, C., Faillace, V. & Vullo, C. (2015). Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. *Small Ruminant Research*, 132, 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.005>

Giorgi, M., Aupanun, S., Lee, H. K., Poapolathep, A., Rychshanova, R., Vullo, C., & Laus, F. (2017). Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites in healthy horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(2), 165–171. <https://doi.org/10.1111/jvp.12342>

Grosenbaugh, D. A., Reinemeyer, C. R., & Figueiredo, M. D. (2011). Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, 23(10), 523–530. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00291.x>

- 329 HINZ, Burkhard et al. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in
 330 humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **The FASEB Journal**, v.
 331 21, n. 10, p. 2343-2351, 2007.
- 332 Imagawa, V. H., Fantoni, D. T., Tatarunas, A. C., Mastrocinque, S., Almeida, T. F., Ferreira,
 333 F., & Posso, I. P. (2011). The use of different doses of metamizol for post-operative
 334 analgesia in dogs. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 38(4), 385–393.
 335 <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2011.00617.x>
- 336 International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of
 337 Pharmaceuticals for Human Use. Harmonized Tripartite Guideline for Good Clinical
 338 Practice ICH E6(R2) Integrated Addendum. Geneva; 2016.
- 339 Jasiocka, A., Maślanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of
 340 metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(1), 207–214. DOI 10.2478/pjvs-
 341 2014-0030
- 342 Kim, T. W., Łebkowska-Wieruszewska, B., Sitovs, A., Poapolathep, A., Owen, H., Lisowski,
 343 A., & Giorgi, M. (2018). Pharmacokinetic profiles of metamizole (dipyrone) active
 344 metabolites in goats and its residues in milk. *Journal of Veterinary Pharmacology and*
 345 *Therapeutics*, 41(5), 699–705. <https://doi.org/10.1111/jvp.12679>
- 346 Lebkowska-Wieruszewska, B., Kim, T. W., Chea, B., Owen, H., Poapolathep, A., & Giorgi,
 347 M. (2018). Pharmacokinetic profiles of the two major active metabolites of metamizole
 348 (dipyrone) in cats following three different routes of administration. *Journal of Veterinary*
 349 *Pharmacology and Therapeutics*, 41(2), 334–339. <https://doi.org/10.1111/jvp.12471>

- 350 Levy, M., Zylber-Katz, E., & Rosenkranz, B. (1995). Clinical pharmacokinetics of dipyrone
 351 and its metabolites. *Clinical Pharmacokinetics*, 28(3), 216–234.
 352 <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00004>
- 353 Lin, J. H. (1994). Dose-dependent pharmacokinetics: experimental observations and theoretical
 354 considerations. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 15(1), 1–31.
 355 <https://doi.org/10.1002/bdd.2510150102>
- 356 Matthews, N., & van Loon, J. P. A. M. (2019). Anesthesia, sedation, and pain management of
 357 donkeys and mules. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 35, 515–527.
 358 <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.007>
- 359 Mealey, K. L. (2019). Breed Differences and Pharmacogenetics: Pharmacotherapeutics for
 360 Veterinary Dispensing, 95. <https://doi.org/10.1002/9781119404576>
- 361 Morresey, P. R., White, G. W., Poole, H. M., Hu, T., Yin, M., & Sundman, E. A. (2019).
 362 Randomized blinded controlled trial of dipyrone as a treatment for pyrexia in horses.
 363 *American Journal of Veterinary Research*, 80(3), 294–299.
 364 <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.3.294>.
- 365 Oliveira, M. G. C. D., Luna, S. P. L., Nunes, T. L., Firmino, P. R., de Lima, A. G. A., Ferreira,
 366 J., & de Paula, V. V. (2020). Postoperative pain behaviour associated with surgical
 367 castration in donkeys (*Equus asinus*). *Equine Veterinary Journal*, 00, 1–6. <https://doi.org/10.1111/evj.13306>
- 369 Mouta, A. N., de Oliveira Lima, I., de Oliveira, M. G. C., Alves, L. P., de Macêdo, L. B.,
 370 Araujo-Silva, G., Perez-Urizar, J. & de Paula, V. V. (2020). Pharmacokinetic properties of
 371 tramadol and M1 metabolite in Northeast Brazilian donkeys (*Equus asinus*). *Journal of*
 372 *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1111/jvp.12935>

- 373 Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzer, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., &
374 Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorganic &*
375 *Medicinal Chemistry*, 20(1), 101–107.
- 376 Taffarel, M. O., Luna, S. P. L., de Oliveira, F. A., Cardoso, G. S., de Moura Alonso, J., Pantoja,
377 J. C., & Murrell, J. C. (2015). Refinement and partial validation of the UNESP-Botucatu
378 multidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in horses. *BMC*
379 *Veterinary Research*, 11(1), 83.
- 380 Vlahov, V., Badian, M., Verho, M., & Bacracheva, N. (1990). Pharmacokinetics of metamizol
381 metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *European*
382 *Journal of Clinical Pharmacology*, 38(1), 61–65. <https://doi.org/10.1007/BF00314805>
- 383 Zanuzzo, F. S., Teixeira-Neto, F. J., Teixeira, L. R., Diniz, M. S., Souza, V. L., Thomazini, C.
384 M., & Steagall, P. V. (2015). Analgesic and antihyperalgesic effects of dipyrone,
385 meloxicam or a dipyrone–meloxicam combination in bitches undergoing
386 ovariohysterectomy. *The Veterinary Journal*, 205(1), 33-
387 37.<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.05.004>

TABLES

TABLE 1 Pharmacokinetic parameters of MAA (mean and standard deviation, except $T_{\max}$) in donkeys after intravenous administration of 10 and 25 mg/kg of metamizole

Parameter	M ₁₀	M ₂₅
$T_{\max}(\text{h})^a$	0.1417 ± 0.059	0.083 ± 0
$C_{\max}(\mu\text{g/mL})$	31 ± 9.637	$100.258 \pm 34.387^*$
$AUC_{0 \rightarrow t}(\text{h} \cdot \mu\text{g/mL})$	14.055 ± 1.942	$44.171 \pm 5.461^*$
$AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{h} \cdot \mu\text{g/mL})$	14.515 ± 1.879	$44.781 \pm 5.526^*$
$MRT_{0 \rightarrow t}(\text{h})$	2.413 ± 0.292	$3.635 \pm 0.347^*$
$MRT_{0 \rightarrow \infty}(\text{h})$	2.843 ± 0.3	$3.916 \pm 0.363^*$
$Ke(\text{h}^{-1})$	$0.256 \pm 0.07^*$	0.199 ± 0.004
$T_{1/2}(\text{h})$	2.69 ± 0.34	$3.624 \pm 0.241^*$

Legend: * indicate statistical differences between treatments. $T_{\max}$: time to reach maximum concentration; $C_{\max}$: maximum concentration; $AUC_{0 \rightarrow t}$: Area under curve from moment 0 to the last measurement; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$: Area under curve from moment 0 to infinity; $MRT_{0 \rightarrow t}$: Mean residual time from moment 0 until the last measurement; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$: Mean residual time from moment 0 to infinity; Ke : elimination rate constant; $T_{1/2}$: Half-life.

^a Categorical variable expressed as a median and a range.

* Significant difference between the groups, $p < .05$

TABLE 2 Pharmacokinetic parameters of AA (mean and standard deviation, except $T_{\max}$) in donkeys after intravenous administration of 10 and 25 mg/kg of metamizole.

Parameter	M ₁₀	M ₂₅
$T_{\max}(\text{h})^a$	0.2158 ± 0.057	0.15 ± 0.058
$C_{\max}(\mu\text{g/mL})$	1.598 ± 0.250	$2.855 \pm 0.550^*$
$AUC_{0 \rightarrow t}(\text{h} \cdot \mu\text{g/mL})$	5.428 ± 1.425	$10.521 \pm 1.244^*$
$AUC_{0 \rightarrow \infty}(\text{h} \cdot \mu\text{g/mL})$	6.801 ± 1.569	$12.494 \pm 1.532^*$
$MRT_{0 \rightarrow t}(\text{h})$	6.700 ± 1.261	7.555 ± 0.608
$MRT_{0 \rightarrow \infty}(\text{h})$	10.958 ± 1.614	11.198 ± 1.428
$K_e(\text{h}^{-1})$	0.146 ± 0.07	0.119 ± 0.06
$T_{1/2}(\text{h})$	6.37 ± 1.30	7.11 ± 1.01

Legend: * indicate statistical difference between treatments. $T_{\max}$: time to reach maximum concentration; $C_{\max}$: maximum concentration; $AUC_{0 \rightarrow t}$: Area under curve from moment 0 to the last measurement; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$: Area under curve from moment 0 to infinity; $MRT_{0 \rightarrow t}$: Mean residual time from moment 0 until the last measurement; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$: Mean residual time from moment 0 to infinity; K_e : elimination rate constant; $T_{1/2}$: Half-life.

^aCategorical variable expressed as a median and a range.

* Significant difference between the groups, $p < .05$

Figure 1: A plot of log10 plasma concentration vs. time for MAA in ten healthy Northeast Brazilian donkeys, following intravenous administration of metamizole at doses of 10 and 25 mg/kg

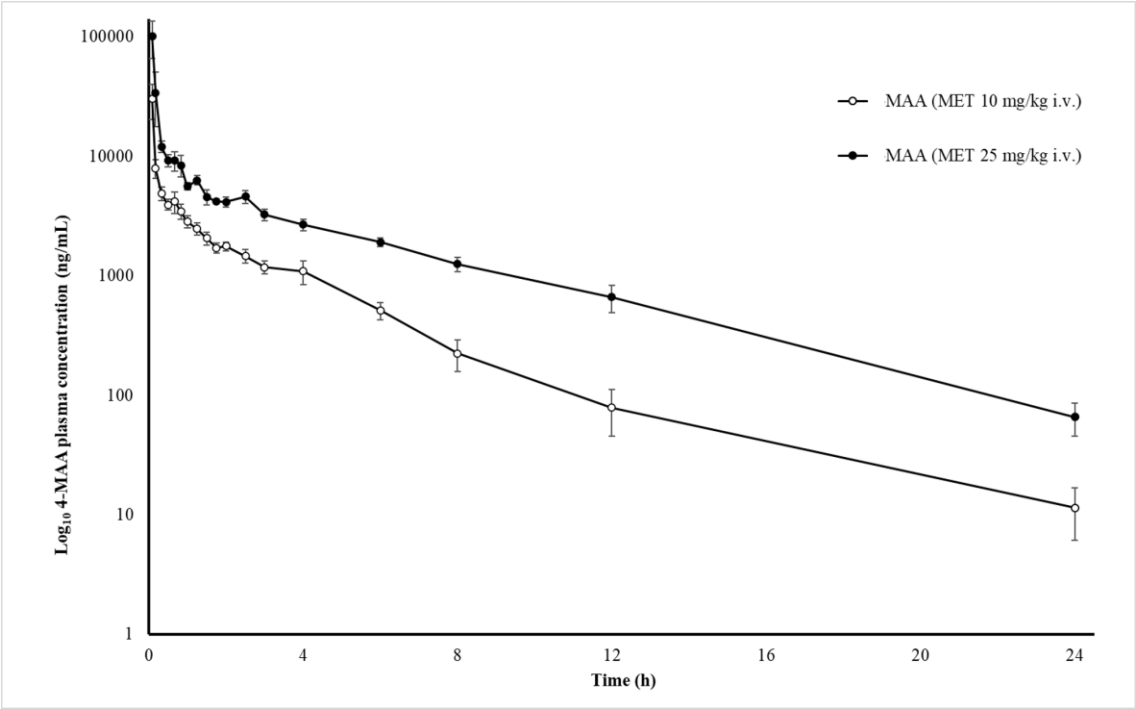


Figure 2: A plot of log10 plasma concentration vs. time for AA in ten healthy Northeast Brazilian donkeys, following intravenous administration of metamizole at doses of 10 and 25 mg/kg

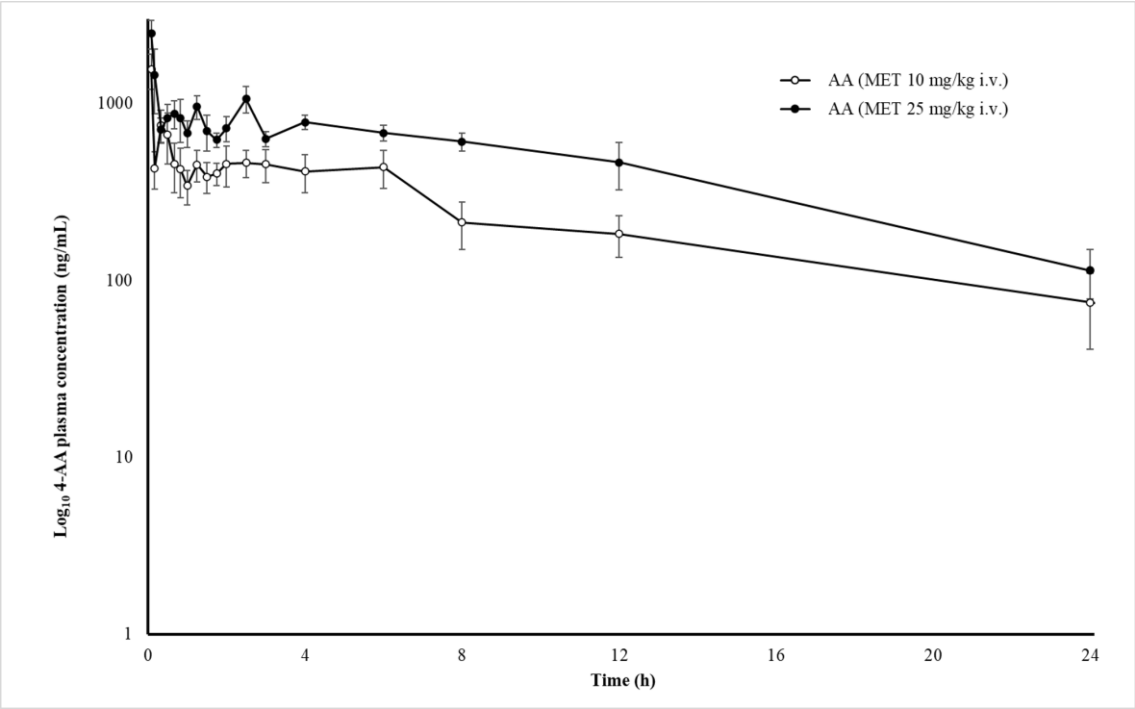
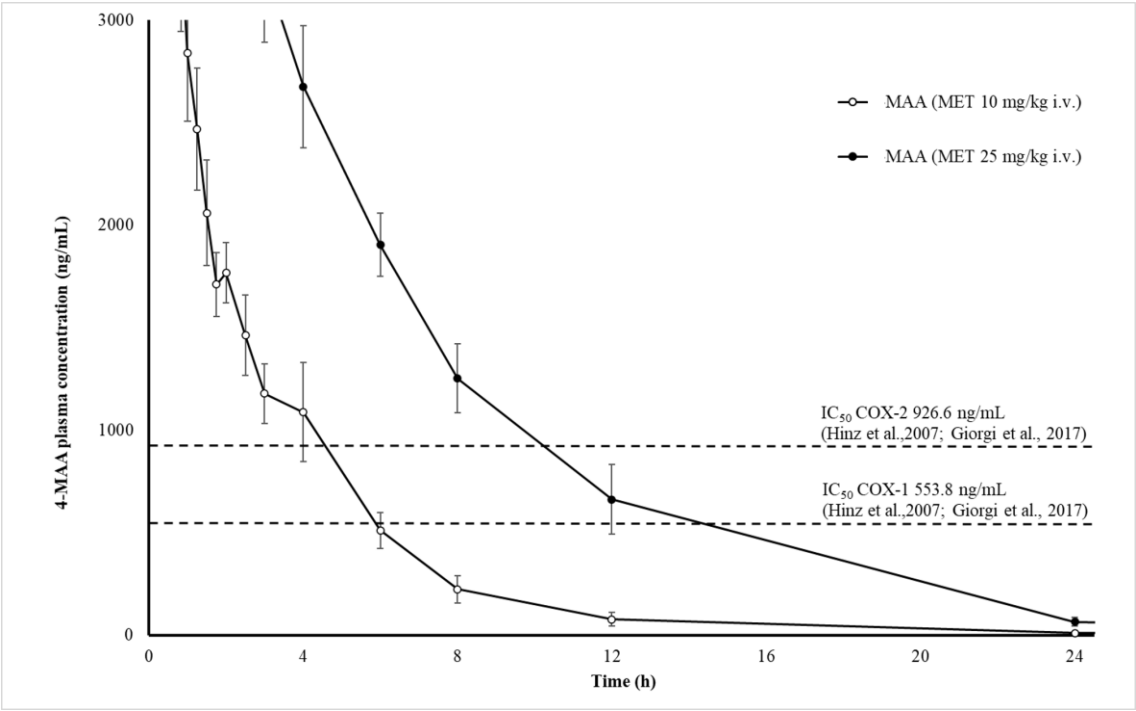


Figure 3: A graph comparing MAA concentration vs. time and minimal effective concentration (MEC) to inhibit cyclooxygenases 1 and 2 after intravenous administration of metamizole at doses of 10 and 25 mg / kg



Capítulo 2: Artigo Farmacocinética da dipirona e do tramadol

Artigo submetido à

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica

Perfil farmacocinético e interação farmacológica do metamizol e seus metabólitos ativos co-administrado com tramadol em Jumentos Nordestinos.

Pharmacokinetic profile and drug-drug interaction of metamizole and its active metabolites co-administered with tramadol in Northeast Brazilian donkeys (*Equus asinus*)

Luã Barbalho de Macêdo^a; Andressa Nunes Mouta^a; Maria Glaucia Carlos de Oliveira^a, Lílían Grace da Silva Solon^b, Gabriel Araújo-Silva^c; José Pérez-Urizar^d; Muriel Magda Lustosa Pimentel^e, Valéria Veras de Paula^{a*}

Luã Barbalho de Macêdo: <https://orcid.org/0000-0002-8274-8797>

Andressa Nunes Mouta: <https://orcid.org/0000-0003-0319-2696>

Maria Glaucia Carlos de Oliveira <https://orcid.org/0000-0002-2929-9590>

Lílían Grace da Silva Solon <https://orcid.org/0000-0001-9558-3867>

Gabriel Araujo-Silva: <https://orcid.org/0000-0002-9073-1995>

José Trinidad Pérez Urizar: <https://orcid.org/0000-0003-0642-0033>

Muriel Magda Lustosa Pimentel <https://orcid.org/0000-0002-3498-4090>

Valéria Veras de Paula: <https://orcid.org/0000-0003-4292-4861>

^a Animal Sciences Department, Universidade Federal Rural do Semi Árido, 59625-900, Mossoró- RN, Brazil.

^b Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, PPGCF, Federal University of Amapá, UNIFAP. Rod Juscelino Kubitschek, Km2, 68903-419. Macapá – AP, Brazil.

^c Organic Chemistry and Biochemistry Laboratory, State University of Amapá, UEAP, Avenida Presidente Vargas, 650, Macapá-AP 68900-070, Brazil.

^d Universidad Autonoma de San Luis Potosí, 78300, San Luis Potosí, S.L.P., México.

^e Centro Universitário Cesmac, 57160-000, Marechal Deodoro – AL, Brazil.

Correspondence author: Valéria Veras de Paula - Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva, Mossoró RN | CEP: 59.625-900, +55 84 3317-8200.

E-mail: valeria@ufersa.edu.br

29

30

Resumo

31 Nesta pesquisa objetivou-se avaliar o perfil farmacocinético e a interação fármaco-fármaco do
 32 metamizol coadministrado com tramadol, em dose única intravenosa. Dez animais receberam
 33 os seguintes tratamentos: 10 mg/kg de dipirona associada a 2mg/kg de tramadol (M10T2) e 25
 34 mg/kg de dipirona com 2mg / kg de tramadol (M25T2). A concentração plasmática dos
 35 fármacos e metabólitos foi realizada por LC-MS / MS. Após a administração, tramadol, 4-
 36 metilamina antipirina e 4-aminoantipirina foram detectados em 24 horas da análise e O-
 37 desmetiltramadol em 12 horas, até 48 horas. Analisando o metabólito tramadol, observou-se
 38 que $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ e Cl/F foram maiores no grupo M10T2 quando comparado ao M25T2. Além
 39 disso, o $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ são significativamente maiores no grupo M25T2. Em
 40 relação ao seu metabólito, M1, $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ foram significativamente maiores
 41 no segundo grupo. O V_z / F ; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$, $t_{1/2}$ de MAA e $MRT_{0 \rightarrow t}$ de AA variaram
 42 significativamente entre os grupos, sendo maior nos animais que receberam 25mg / kg de
 43 metamizol. Conclui-se que o metamizol quando coadministrado com tramadol interfere no
 44 metabolismo um do outro e a posologia precisa de ajustes.

45 Palavras-chave: Perfil farmacocinético; Interação Droga-Droga; Analgésicos; Metabólitos

Abstract

47 In this research aimed to evaluate the pharmacokinetic profile and drug-drug interaction of
 48 metamizole co-administered with tramadol, by a single intravenous dose. Ten animals received
 49 the following treatments: 10 mg/kg of dipyrone associated with 2mg/kg of tramadol ($M_{10}T_2$)
 50 and 25 mg kg of dipyrone with 2mg/kg of tramadol ($M_{25}T_2$). The drugs and metabolites plasma
 51 concentration were performed by LC-MS/MS. After administration, tramadol, 4-methylamine
 52 antipyrine, and 4-aminoantipyrine were detected within 24 hours of analysis and O-
 53 desmethyltramadol after 12 hours, until 48 hours. Analyzing the tramadol metabolite, it was
 54 observed that $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ and Cl/F were higher in the group $M_{10}T_2$ when compared to the $M_{25}T_2$.
 55 Furthermore, the $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ are significantly higher in the $M_{25}T_2$ group. Regarding
 56 its metabolite, M1, $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ were significantly higher in the second group.
 57 The V_z / F ; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$, $t_{1/2}$ of MAA, and $MRT_{0 \rightarrow t}$ of AA varied significantly between groups,
 58 being higher in animals that received 25mg/kg of metamizole. It is concluded that metamizole
 59 when co-administered with tramadol interfere with the metabolism of each other and the
 60 posology will need adjust.

61 **Keywords:** Pharmacokinetic profile; Drug-Drug Interaction; Analgesics; Metabolites.

1. Introduction

Donkeys are animals that work, mainly, in sub developing countries, to transport goods and people, often in extreme heat and humidity, noise, pollution of the urban work environments, in which are submitted to risks of accidents due to heavy traffic (Regan *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2016). These factors predispose these animals to trauma and other pathologies that can be associated with painful processes, inflammation and stress.

Equine pain can be quite debilitating and represents the main cause of euthanasia because of pathologies such as laminitis or colic syndrome (Matthews and Carroll, 2007). Therefore, the pain management is important for the well-being and health of equines, existing currently in veterinary medicine just a few licensed pain control drugs in this especially useful species (Tavanaeimanesh *et al.*, 2018).

Metamizole (MET), also known as dipyrone, is a non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) of particular interest to veterinary medicine because it presents good analgesic effect and excellent antipyretic property, and it is indicated for the treatment of colic syndromes, muscle pains, fevers and after surgical interventions (Cook and Blikslager, 2015; Giorgi *et al.*, 2017). However, it was withdrawn from the market in the United States, Japan, Iran, and the United Kingdom for having a rare side effect in humans, a hematological condition called agranulocytosis (Hedenmalm and Spigset, 2002). MET is rapidly hydrolyzed to its metabolites 4-methylaminoantipyrine (MAA) and its by-product, 4-aminoantipyrine (AA), in which the pharmacological effects are attributed to the MAA that is formed in much larger amounts compared to other metabolites (*N*-formyl-4-aminoantipyrine, FAA; and *N*-acetyl-4-aminoantipyrine, AAA) (Kim *et al.*, 2018).

Tramadol (TRA) is an opioid analgesic widely prescribed by veterinarians (Abbiati *et al.*, 2017). It is a off-label drug used in the treatment of acute and chronic pain in animals (Udegbonam *et al.*, 2015; Bortolami *et al.*, 2015). Pharmacokinetic studies of tramadol and its main metabolite, *O*-Desmethyltramadol (M1) indicated interspecies differences in drug metabolism, supporting the fact that pharmacokinetic studies are necessary to determine the dosage regimens for each of them (Cagnardi *et al.*, 2011; Sheikholeslami *et al.*, 2016. Evenson and Mans, 2019).

The association of an opioid with an NSAID can produce additive or supereadditive effects while increasing the adverse effects (Moreno-Rocha *et al.*, 2016). In a previous study, 25

combinations of different doses of metamizole (56.2 - 562.3mg / kg) and tramadol (3.2 to 56.2 mg / kg) were tested in a single administration, and in all of them whether additive or potentiated antinociceptive effect in mice when compared to treatment using drugs alone (López-Muñoz *et al.*, 2013).

The pharmacology of several drugs is poorly understood in donkeys due to the lack of pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in this species and that the drugs are often used based on treatments prescribed for horses since few have their use recommended for the species in question. Besides, donkeys differ from horses in behavioral, physiological, and pharmacological terms (Matthew and Van Loon, 2013). Therefore, the knowledge of the pharmacokinetic properties of drugs is fundamental to guarantee an effective and safe therapeutic administration (Abbiati *et al.*, 2017).

Consequently, the present study aimed to evaluate the pharmacokinetic parameters of the metabolites of metamizole in association with tramadol and its active metabolites administered in a single dose intravenously in donkeys, checking if there is any pharmacokinetic drug-drug interaction.

2. Materials and Methods

The metamizole analytical standard (99% purity) was purchased from the European Pharmacopoeia. Standards of metamizole's metabolites (4-methylaminoantipyrine (MAA), 4 – aminoantipyrine (AA), tramadol and O-desmethyltramadol (M1), were purchased from Sigma-Aldrich® as well as the internal standard metoprolol. The acetonitrile used in the mobile phase was purchased from J.T Baker® (Fisher Scientific). The sodium metamizole used in this study was purchased from ZOETIS (D500®, solution for injection, 500mg / ml, São Paulo, SP-Brazil) and tramadol was acquired by Cristalia (Tramadon®, Cristália, SP – Brazil).

This study was submitted to committee of ethics of studies involving animal use under the register 23091.006896/2019-47. All the animals were from the Apodi Animal Protection Association, and all animal manipulation was carried out in accordance with the good practices of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Ten Brazilian Northeastern donkeys, male, entire, adults, weighing an average of 124.80 ($\pm$ 13.2) kg, from the Apodi Animal Protection Association, were used. Only healthy donkeys were included in the study, confirmed by clinical examination (cardiorespiratory and abdominal auscultation, capillary refill time, mucous membrane colour, and faecal characteristics), blood

count, and serum biochemical analysis (urea, creatinine, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and total proteins).

The animals were dewormed with 0.2 mg/kg body weight (bwt) of ivermectin intramuscular (IM) (Ivomec[®]) and vaccinated against rabies (Rai-Vet Líquida[®]) four weeks before the start of the study. They were housed in groups of five in a 17 x 13 m outdoor area with shade. Donkeys were fed with 7.5 kg/100 kg bwt of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) and 1.1 kg/100 kg bwt of concentrate (ground corn, soybean, wheat bran, common salt, and calcitic limestone) twice daily and had *ad libitum* access to water. The period of acclimatisation to the new environment and human interaction was four weeks

Control blood samples were collected from donkeys before the start of the experiment.

Twelve hours before the beginning of the experiment, the animals have fasted for food and four hours later they also have fasted for water. Then to allow both intravenous drug administration and blood collection, a 16G gauge catheter was attached to the jugular vein and a 3-way tap was attached to it.

After the collection control blood sample, donkeys received the following treatments: In treatment 1 (M₁₀T₂) 10 mg / kg of metamizole and 2mg / kg of tramadol, and treatment 2 (M₂₅T₂) - 25 mg / kg of metamizole and 2mg / kg of tramadol. All treatments were slow intravenous administration (2 min) and was performed by the same applicator. After the application of the drugs, blood samples (10 mL) were collected at the following times: 0 (before drug administration) and 5, 10, 20, 30, 40, 50 minutes, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, and 48.0 after drug administration. Plasma samples were separated within 30 minutes after drawing by centrifugation at 1.715g for 10 minutes at room temperature. Plasma was stored frozen (–80°C) in cryogenic tubes until analysis.

Concomitantly, the animals were monitored in case of any behavioral reaction (ataxia, restlessness, salivation, sweating, and muscle spasms) during the period of the experiment.

To 250 µl of plasma spiked with stock solution (curve samples, quality control, and subject sample), 10 µl of 0.1 mg/mL metoprolol (internal standard, IS) and 800 µl of acetonitrile were added. Then samples were homogenized by vortex for 60 seconds, after which the samples were centrifuged for 5 minutes at 13.550g, and a 4.0 µL aliquot of the solution was injected into the LC-MS/MS system for analysis.

For the determination of MAA, AA, tramadol and M1, an analytical method was developed in positive electrospray ionization ESI (+) using a UPLC-MS/MS system consisted of a Nexera 2 UPLC (Shimadzu) coupled to an LCMS-8040 mass spectrometer (Shimadzu) and a BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1 $\times$ 75 mm) (Waters, USA).

Acetonitrile and a 0.1% formic acid solution (75:25, v/v) were used as mobile phase at 0.3 mL/min. The running time was 2.0 min; the injected sample volume was 5.0 μ L. The column temperature was set to 40°C and the autosampler cooler to 5°C. For MAA, AA, tramadol and M1, the mass spectrometer was adjusted in multiple reaction monitoring (MRM) mode in ESI positive ionization mode. The collision energy and cone voltage were 12 and 19 V, respectively. The cone gas flow rate and desolvation were calibrated to 150 and 600 L/min, respectively, using argon as the collision gas at a flow rate of 0.15 mL/min. Tandem mass spectrometer was tuned to monitor m/z 218.0 $\rightarrow$ m/z 159.0, m/z 204.0 $\rightarrow$ m/z 77.0, m/z 264.0 $\rightarrow$ m/z 58.0, 250.0 $\rightarrow$ 58.0 and 268.1 $\rightarrow$ 131.1 transitions for MAA, AA, tramadol, M1 and metoprolol respectively with dwell time of 0.3 s. MRM data were acquired and analyzed through Labsolution software (Shimadzu).

The analytical method was validated according to the criteria established by the International Conference on Harmonization (ICH E6 - R2, 2016) and by the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) in the Resolution of the Collegiate Board (RDC) number 166/2017.

The standard solutions were added to the drug-free plasma to obtain the calibration curve. Likewise, quality control samples (QC control points) were prepared in low, medium, and high concentrations, and these were used to determine absolute recovery and intra- and inter-day precision.

The Selectivity was assessed by preparing the lower limit of quantification (LLOQ) in the drug-free plasma. While the stability of plasma at -70 ° C; at room temperature of 20 ° C; 3 freeze-thaw cycles and samples processed in the automatic sampler; were also evaluated. The values are shown in Table 1.

Table 1. Working range of the calibration curves and concentration of the QC control points for validation of the analytical method.

Analyte	Range (ng/mL)	QC control points (ng/mL)
Tramadol	5 – 5000	15; 1000; 3750

O-desmethyltramadol	5 – 5000	15; 1000; 3750
4-methylaminoantipyrine	800 – 40000	2400; 12000; 30400
4-aminoantipyrine	800 – 40000	2400; 12000; 30400
Metoprolol (IS)	1000	NA

The pharmacokinetic profiles were performed using a non-compartmental model and with the aid of the WinNonlin 6.2.1 software (Pharsight, Mountain View CA, USA, 2011). The observed variables were: the maximum plasma concentration (C_{max}), the time to reach C_{max} (T_{max}), the area under the plasma concentration curve from time zero until the moment of the last measurable concentration ($AUC_{0 \rightarrow t}$) and the extrapolation of the AUC to infinity ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$), apparent volume of distribution (V_z / F), apparent clearance (CL / F), elimination half-life ($T_{1/2}$); Mean residual time until the last measurement ($MRT_{0 \rightarrow t}$), Mean residual time from zero to infinity ($MRT_{0 \rightarrow \infty}$)

Statistical analysis was performed with BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá). The normality of all parameters was analyzed by the Shapiro Wilk test. With the exception of T_{max} which was evaluated by the Mann Whitney test and expressed as a median, all other parameters were compared using the T test and expressed as mean and standard deviation. A significant different was considered when $p < 0.05$.

3. Results

After the optimization of the chromatographic parameters and definition of the analytical variables, the method was validated to guarantee the veracity of the data obtained. Analytical methods demonstrated linearity in the range for all analytes and all calibration curves showed R^2 greater than 0.99. The method also showed good parameters of selectivity, reproducibility, and repeatability with relative standard deviations below 5%. And the samples were stable under the conditions used for analysis. No matrix effect is observed, as the coefficient of variation is below 15% when the areas are compared with and without biological matrix. The mean plasma concentrations of tramadol, M1, MAA, and AA were plotted on a comparative chart concerning the elapsed time (Figure 1).

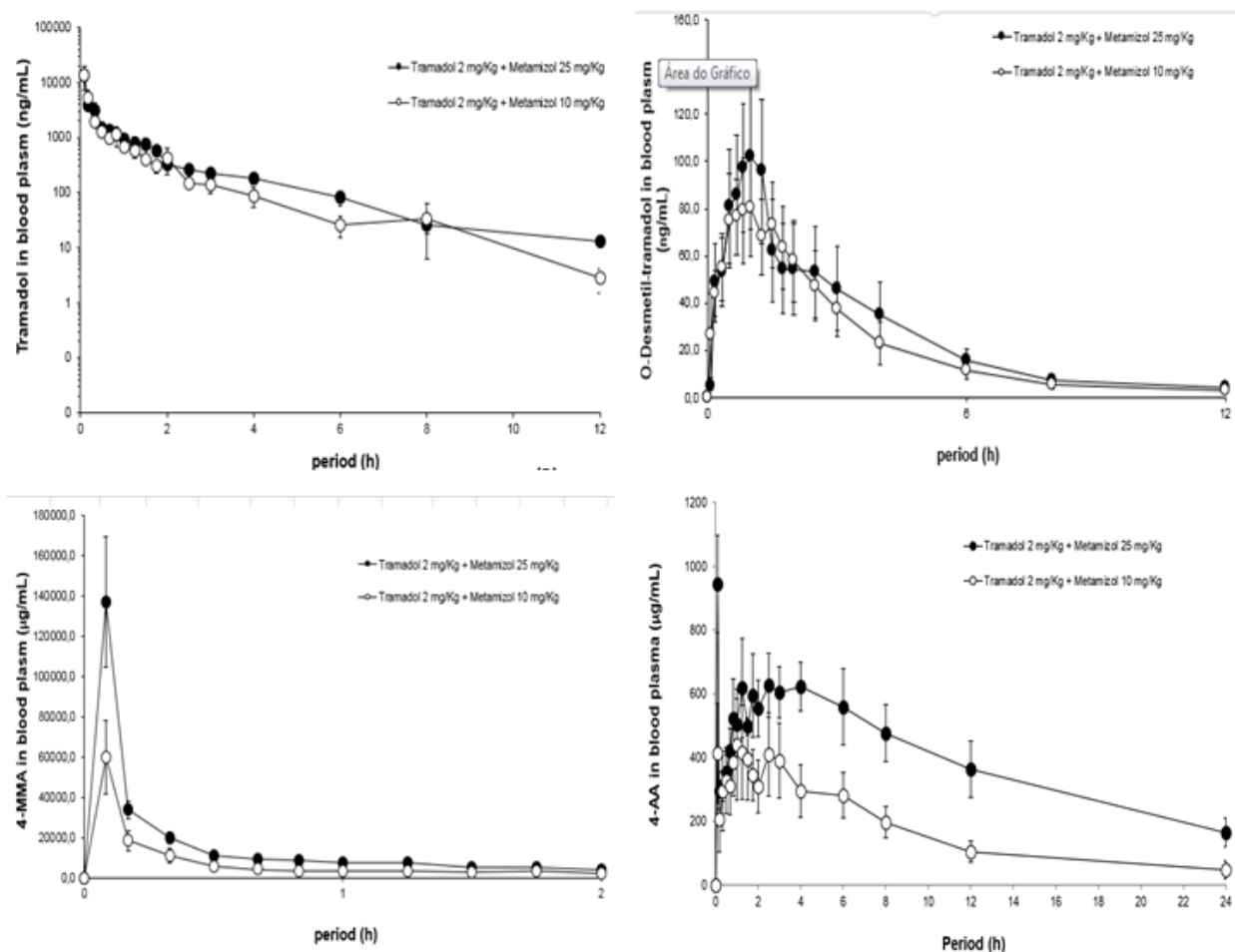


Figure 1. A plot plasma concentration vs. time for tramadol (A); O- desmethyltramadol (B); 4-methylaminoanthypyrine (C) and 4-aminoantipyrine (D) AA in ten healthy Northeast Brazilian donkeys, following intravenous administration of metamizole at doses of 10 and 25 mg/kg associated with 2mg/kg of tramadol.

After the intravenous administration, TRA, MAA, and AA were detected within 24 hours of analysis and M1 within 12 hours. It was not possible to measure the blood concentrations of MET due to its behavior in biological media.

Table 2 shows the pharmacokinetic parameters obtained after intravenous administration of metamizole at doses of 10mg/kg or 25mg/kg in association with tramadol (2mg/kg).

Table 2. Pharmacokinetics parameters of tramadol, O-desmethyltramadol, 4-methylaminoantipyrine and 4-aminoantipyrine obtained after intravenous administration of metamizole at doses of 10mg/kg or 25mg/kg in association with tramadol (2mg/kg).

Parameter*	Tramadol		M1		MAA		AA	
	M10T2	M25T2	M10T2	M25T2	M10T2	M25T2	M10T2	M25T2
$T_{\max}^a$ (h)	0,102 ± 0,083	0,083 ± 0,083	0,722 ± 0,670	0,907 ± 0,830	0,102 ± 0,083	0,1023 ± 0,083	1,564 ± 100	0,907 ± 0,083
$C_{\max}$ (ng/mL)	15811,64 ± 12499,6	13776 ± 10130,53	93,911 ± 57,825	123,674± 90,992	160620,4 ± 119376,1	128522,3 ± 120713,1	1941,968 ± 1542,152	1067,016 ± 1096,489
$AUC_{0 \rightarrow t}$ (h.ng/mL)	3829,11± 3378,20	5008,90± 4353,65	294,990 ± 210,671	470,540 ± 307,558	52734,52 ± 47535,81	49714,78 ± 45899,33	9258,003 ± 7808,462	9266,812 ± 7681,148
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (h.ng/mL)	3882,30 ± 3439,15*	2766,10 ± 2230,07	302,82 ± 224,085	584,295 ± 412,092	53697,77 ± 48238,15	52222,42 ± 46418,61	14174,86 ± 8971,943	11981,26 ± 8856,709
$t_{1/2}$ (h)	8,12 ± 8,5	13,62 ± 12,2*	6,11 ± 5,8	13,50 ± 9,64*	2,05 ± 1,83	4,51 ± 3,47*	9,41 ± 7,04	10,47 ± 12,10
V_z/F (ml/h/kg)	0,009 ± 0,007	0,0080 ± 0,0079	0,080 ± 0,050	0,0832 ± 0,0773	0,0016 ± 0,0012	0,00342 ± 0,0021*	0,0332 ± 0,034	0,03711 ± 0,035
CL/F (ml/h/kg)	0,000756 ± 0,0006*	0,00042 ± 0,004	0,0093 ± 0,0089	0,00548 ± 0,0049	0,000544 ± 0,0005	0,00049 ± 0,0005	0,00313 ± 0,0028	0,0025 ± 0,0028
$MRT_{0 \rightarrow t}$ (h)	1,142 ± 1,393	4,219 ± 3,6132*	5,096 ± 4,196	18,247 ± 11,658*	1,949 ± 1,8212	3,0721 ± 2,6395	5,850 ± 4,849	8,880 ± 8,735*
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$ (h)	2,104 ± 1,732	8,347 ± 5,3675*	4,762 ± 4,082	15,825 ± 11,745*	1,9201 ± 1,7662	3,996 ± 3,61*	14,039 ± 10,703	15,55 ± 17,87

* Results are presented as the mean of $n = 10 \pm SD$. $T_{\max}$: time of maximum concentration; $C_{\max}$: maximum concentration; $AUC_{0 \rightarrow t}$: area under the curve from time zero to time t , where t is the time of the last measurable concentration, calculated using the linear trapezoidal rule; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$: area under the curve from time zero to infinity; V_z/F : volume of distribution scaled by bioavailability; $t_{1/2}$: elimination half-life; CL/F : clearance divided by bioavailability; $MRT_{0 \rightarrow t}$: mean residence time from zero to time t ; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$: mean residence time from zero to infinity.

^aCategorical variable expressed as a median and a range.

Analyzing the TRA metabolite, it was observed that $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ and CL / F were higher in the group treated with 10mg / kg of metamizole when compared to the 25mg / kg. While $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ are significantly higher in the $M_{25}T_2$ group. Regarding its by-product, M1, $t_{1/2}$; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$; $MRT_{0 \rightarrow t}$ were significantly higher in the second group.

The V_z / F ; $MRT_{0 \rightarrow \infty}$, $t_{1/2}$ of MAA and $MRT_{0 \rightarrow t}$ of AA varied significantly between groups, being higher in animals that received 25mg / kg of metamizole.

Behavioral changes such as agitation and ataxia were observed in 2 animals in the $M_{25}T_2$ group, which was not observed in the $M_{10}T_2$ group.

4. Discussion

In this study, the evaluation of the pharmacokinetic profile of two doses of metamizole in co-administration with 2mg/kg of tramadol in donkeys, through the administration of a single dose of both drugs intravenously and the interaction between these two drugs were investigated.

The association of metamizole and tramadol has been widely used in the treatment of moderate to severe pain in animals affected by neoplasms, arthritis or undergoing castration surgery (Imagawa *et al.*, 2011; Flôr *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2013; Moreno-Rocha *et al.*, 2016). And the results have shown that the association has the potential to increase the effect on pain management (Moreno-Rocha *et al.*, 2012). However, these reports were in small animals or laboratory animals.

The knowledge of the metabolic differences between horses and donkeys is necessary when doses and intervals of administration are extrapolated for donkey therapy from doses recommended for horses. For drugs in which the clearance tends to be faster than in horses, it may not be advisable to increase the dosage to obtain a longer dosage interval, as well as increased bioavailability and a lower apparent V_d for some drugs may predispose the donkeys to toxicity (Grosenbaugh *et al.*, 2011). So it must be carried out with great caution.

This is the first study evaluating the pharmacokinetic profile of the association of tramadol and metamizole in donkeys. The data obtained from this research will provide a scientific basis for future pharmacodynamic studies or clinical trials to evaluate pain in this species.

Metamizole is a drug that in contact with the blood is rapidly hydrolyzed into its two metabolites (MAA and AA) (Morresey *et al.*, 2019) and therefore it was not possible to obtain the minimum concentrations for quantification at predetermined times, making the construction of the pharmacokinetic profile of this prodrug impossible. And because of this, its metabolites (MAA and AA) are used as markers for pharmacokinetic studies of this drug (Kim *et al.*, 2018). And tramadol it is a drug carried to the liver where it is metabolized in M1 and can be measurable by the method employed.

O-desmethyltramadol and 4-methylaminoantipyrine, the active by-products of tramadol and metamizole respectively, are metabolites with more potent analgesic activity than their parent drugs (Giorgi *et al.*, 2009; Giorgi *et al.*, 2017). Both being metabolized by the enzyme CYP3A4 (Moreno-Rocha *et al.*, 2016), justifying that the dose change from 10 to 25mg / kg in metamizole provides a longer permanence of these substances in the blood which can be visualized by the significant increase in MRT and the $t_{1/2}$ in the groups treated with 25mg / kg of metamizole and in donkeys that received only 2.5 mg / kg of tramadol intravenously (Giorgi *et al.*, 2009), thus suggesting that the combination may enhance the therapeutic effect of these drugs .

The tramadol clearance was higher in animals that received 10mg / kg of metamizole. Both drugs are metabolized by the same enzyme. The results suggest that increasing the dose of metamizole promotes competition for the CYP3A4 binding site, reducing the metabolism of TRA and prolonging its elimination.

It has been shown that tramadol has a half-life of 1.55 hours in donkeys, being rapidly metabolized to N-desmethyltramadol, an inactive metabolite (Giorgi *et al.*, 2009) and that this rapid transformation contributes to the drug smaller effectiveness in this species than in others. Concomitant administration with metamizole increased the half-life of tramadol to 8.12h (10 mg / kg metamizole) and 13.62h (25 mg / kg) as well as M1 (active metabolite in animals).

The association of these drugs suggests increasing the clinical efficiency of tramadol in donkeys. However, clinical trials are needed to prove whether this increase in half-life is useful for pain management. The increase in metamizole dose promoted an increase in the half-life of tramadol and O-desmethyltramadol. These three substances are metabolized in the liver under the action of the cytochrome p450 enzyme variation 3A4, causing it to become overloaded and thus reduce the speed of metabolization of these drugs. However, it is not possible to say that this half-life extension can be beneficial from a clinical point of view. Since it was observed

that the continuous administration of the association of tramadol and metamizole in rats submitted to pain test, at first they promoted an improvement in the response, however with the subsequent doses there was a reduction in its efficiency by up to 40%, probably due to the increased opioid tolerance in the animal (Moreno-Rocha *et al.*, 2012).

Stewart *et al.* (2011) evaluating the pharmacokinetics and side effects of intravenous administration of tramadol in horses, observed muscle fasciculations 3 minutes after the application of 5 mg / kg of tramadol in 7 of the 12 animals studied. However, in the donkeys treated with tramadol, and the mice treated with the association of tramadol and metamizole, no adverse reactions were observed (Giorgi *et al.*, 2009; Moreno-Rocha *et al.*, 2016). Probably the reactions found in the two donkeys who received metamizole and tramadol (M₂₅T₂) were due to the speed of administration or the volume administered. Since there was no statistical difference in the C_{max} of tramadol and M1 in the groups treated with 10 mg / kg or 25 mg / kg of metamizole, and it has already been proven that the intravenous administration of drugs in large volume and quickly causes adverse effects, mainly, of neurological order (McMillan *et al.*, 2008; Dhanjal *et al.*, 2009), as reported in our study.

As this study aimed to evaluate the pharmacokinetic profile of analgesic drugs widely used in companion species, it is only possible to state whether there is interaction within the scope of the metabolism of these drugs and it is not possible to infer which of the two associations is more beneficial in the treatment of pain, requiring more clinical studies are needed to resolve these issues.

5. Conclusion

Pharmacokinetic studies in the *Equus asinus* species are very scarce in the literature, and this is the first to study the occurrence of drug interaction in the co-administration of tramadol and metamizole in donkeys, suggesting that that metamizole and tramadol interfere with each other's metabolism. However, clinical studies are necessary so that it can establish the dosage that best meets the analgesic needs of the species and, thus, eliminating the extrapolation of doses commonly used in horses.

Acknowledgements

Funding source: The present work was carried out with the support of CAPES, Coordination for the improvement of higher education personnel - Brazil, within the scope of the General Program of International Cooperation - PGCI;.

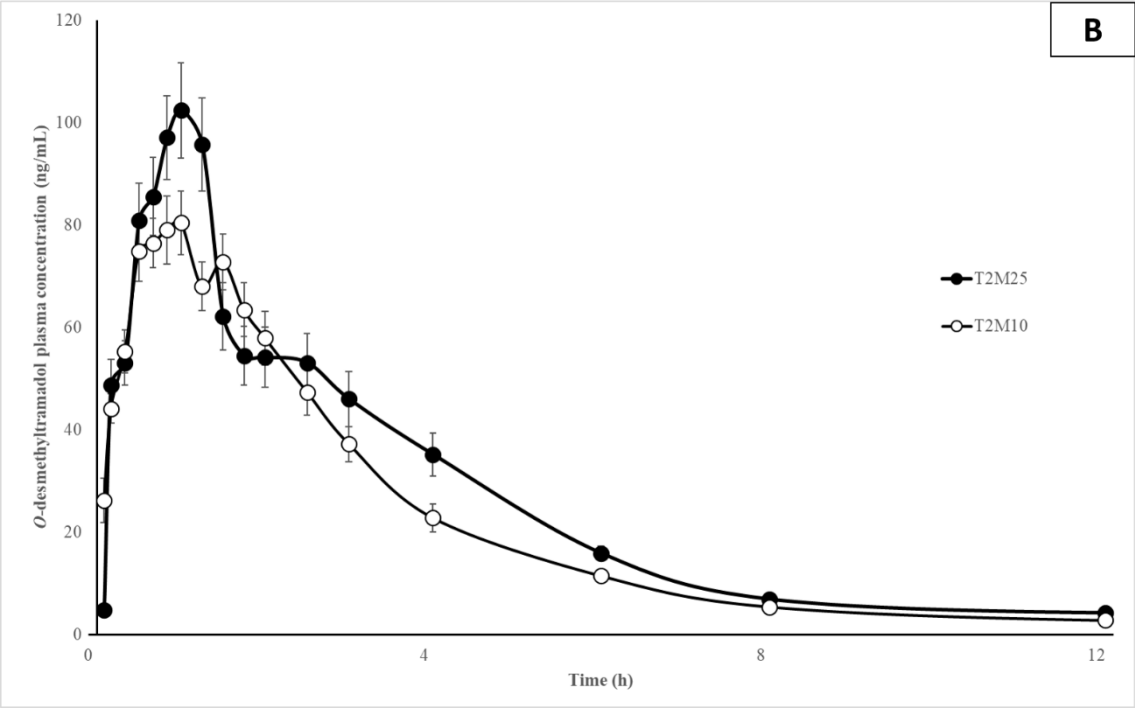
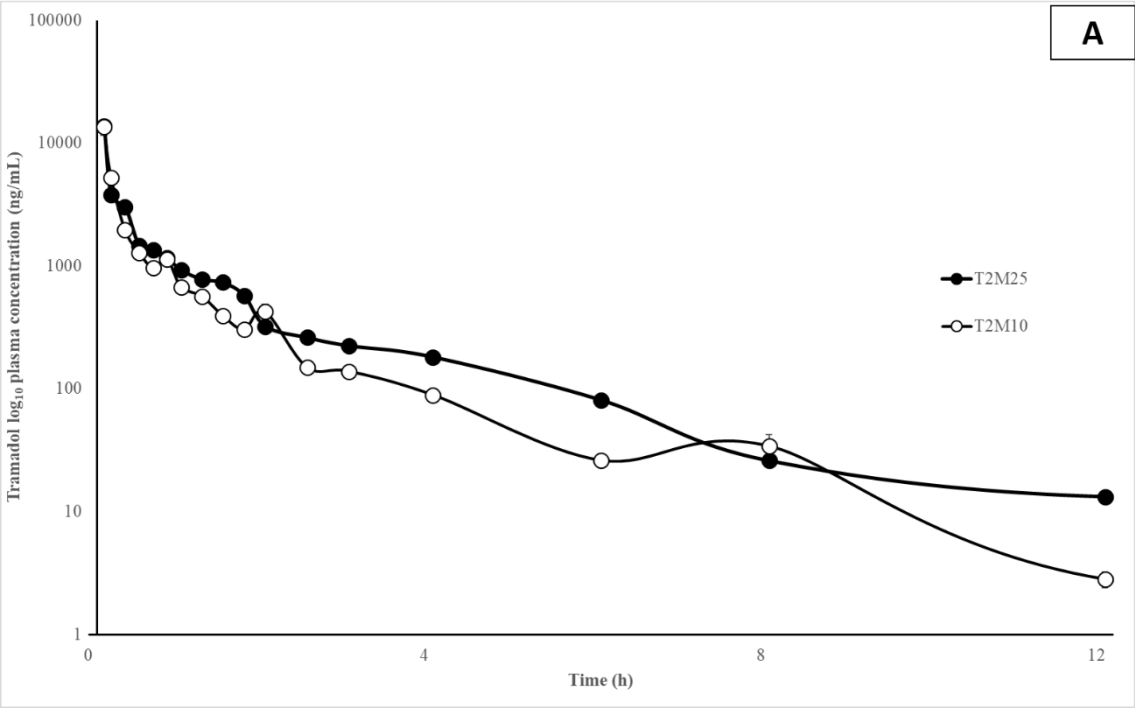
324 References

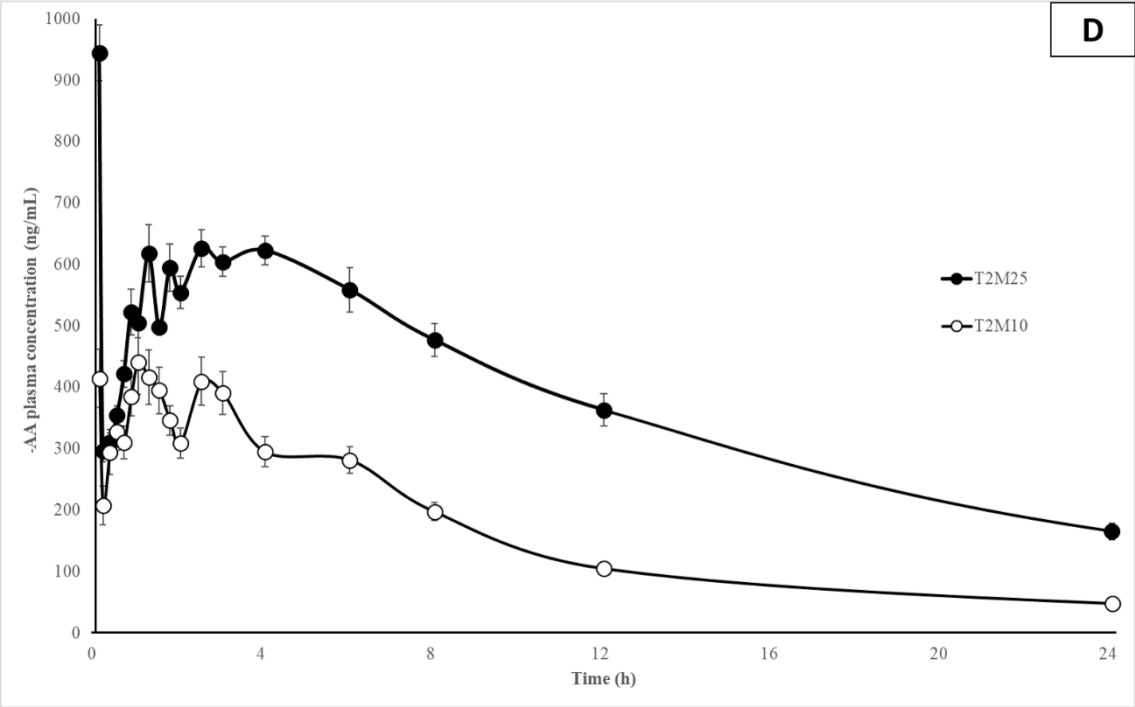
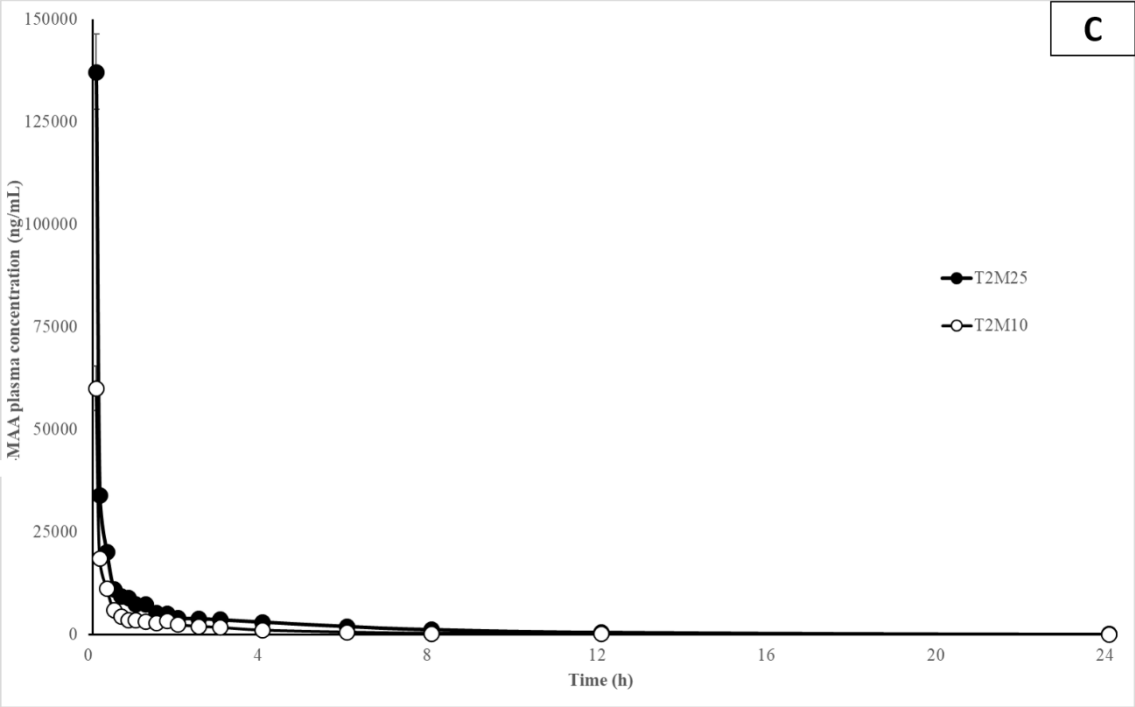
- 325 ABBIATI, Roberto Andrea et al. A physiologically based model for tramadol pharmacokinetics
326 in horses, v. 429, p. 46-51,. J. Theor. Biol., 429, 46-51. 2017
327 <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.028>
- 328 ANVISA, B., 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria
329 Colegiada-RDC Nº 166.
- 330 BORTOLAMI, E. et al. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its
331 metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep., Vet
332 J, 205(3), 404-409, . <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.011>
- 333 CAGNARDI, P. et al. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of
334 tramadol in cats. Res Vet Sci, 90(3), 503-509, 2011.
- 335 COOK, Vanessa L.; BLIKSLAGER, Anthony T. The use of nonsteroidal anti-inflammatory
336 drugs in critically ill horses. J Vet Emerg Crit Care, 25(1), 76-88. 2015.
337 <https://doi.org/10.1111/vec.12271>
- 338 DAI, Francesca et al. Welfare conditions of donkeys in Europe: Initial outcomes from on-farm
339 assessment. Animals, v. 6, n. 1, p. 5, 2016. <https://doi.org/10.3390/ani6010005>
- 340 DHANJAL, Jusmeen K. et al. Intravenous tramadol: effects, nociceptive properties, and
341 pharmacokinetics in horses. Veterinary anaesthesia and analgesia. Vet Anaesth Analg, 36(6),
342 581-590, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2009.00492.x>
- 343 EVENSON, Emily; MANS, Christoph. Antinociceptive efficacy and safety of subcutaneous
344 tramadol in chinchillas (*chinchilla lanigera*). Journal of Exotic Pet Medicine. J Exot Pet
345 Med, 28, 98-104, 2019.. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.01.003>
- 346 FLÔR, Patrícia B. et al. Tramadol plus metamizole combined or not with anti-inflammatory
347 drugs is clinically effective for moderate to severe chronic pain treatment in cancer patients. Vet
348 Anaesth Analg, 40(3), 316-327, 2013. <https://doi.org/10.1111/vaa.12023>
- 349 GIORGI, Mario et al. Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites in healthy
350 horses. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, J Vet Pharmacol Ther, 40(2),
351 165-171, 2017. <https://doi.org/10.1111/jvp.12342>

- GIORGI, Mario et al. Pharmacokinetics of tramadol and its metabolites M1, M2, and M5 in donkeys after intravenous and oral immediate release single-dose administration. **J Equine Vet Sci**, 29(7), 569-574, 2009 . <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.05.010>
- GIORGI, M. et al. Pharmacokinetic profiles of the active metamizole metabolites after four different routes of administration in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, 41(3), 428-436, 2017. <https://doi.org/10.1111/jvp.12484>
- GROSENBAUGH, D. A.; REINEMEYER, C. R.; FIGUEIREDO, M. D. Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Vet Educ*, v. 23, n. 10, p. 523-530, 2011.
- HEDENMALM, Karin; SPIGSET, Olav. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). *Eur. J. Clin. Pharmacol*, v. 58, n. 4, p. 265-274, 2002.
- IMAGAWA, Vivianne H. et al. The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs. *Vet Anaesth Analg*, v. 38, n. 4, p. 385-393, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2011.00617.x>
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2016, Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice ICH E6(R2). Integrated Addendum. Geneva.
- KIM, Tae Won et al. Pharmacokinetic profiles of metamizole (dipyrone) active metabolites in goats and its residues in milk. . *J Vet Pharmacol Ther*, v. 41, n. 5, p. 699-705, 2018.. <https://doi.org/10.1111/jvp.12679>
- LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco Javier et al. Enhancement of antinociception but not constipation by combinations containing tramadol and metamizole in arthritic rats. *Archives of Medical Research*, v. 44, n. 7, p. 495-503, 2013.
- MATTHEWS, Nora S. et al. Review of equine analgesics and pain management. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Orlando, Florida. 2007. p. 240-4.
- MATTHEWS, N.; VAN LOON, J. P. A. M. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. *Equine Veterinary Education*, v. 25, n. 1, p. 47-51, 2013.. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00312.x>

- 380 MCMILLAN, Chantal J. et al. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. Can. J. Vet.
381 Res., v. 72, n. 4, p. 325, 2008.
- 382 MORENO-ROCHA, Luis Alfonso et al. Antinociceptive effects of tramadol in co-
383 administration with metamizol after single and repeated administrations in rats. Pharmacol.
384 Biochem. Behav, v. 103, n. 1, p. 1-5, 2012.. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.07.011>
- 385 MORENO-ROCHA, Luis Alfonso et al. Effect of tramadol on metamizol pharmacokinetics
386 and pharmacodynamics after single and repeated administrations in arthritic rats. Saudi Pharm
387 J, v. 24, n. 6, p. 674-684, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.06.005>
- 388 MORRESEY, Peter R. et al. Randomized blinded controlled trial of dipyrone as a treatment for
389 pyrexia in horses. American journal of veterinary research, v. 80, n. 3, p. 294-299, 2019.
390 <https://doi.org/10.2460/ajvr.80.3.294>
- 391 REGAN, Fran H. et al. Behavioural repertoire of working donkeys and consistency of
392 behaviour over time, as a preliminary step towards identifying pain-related behaviours. PLoS
393 One, v. 9, n. 7, p. e101877, 2014.. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101877>
- 394 SHEIKHOLESLAMI, Behjat et al. Evaluation of the route dependency of the pharmacokinetics
395 and neuro-pharmacokinetics of tramadol and its main metabolites in rats. Eur J Pharm Sci, v.
396 92, p. 55-63, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.021>
- 397 STEWART, Allison J. et al. Pharmacokinetics of tramadol and metabolites O-
398 desmethyltramadol and N-desmethyltramadol in adult horses. Am J Anim Vet Sci, v. 72, n. 7,
399 p. 967-974, 2011. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.7.967>
- 400 TAVANAEIMANESH, Hamid et al. Comparison of Analgesic Effects of a Constant Rate
401 Infusion of Both Tramadol and Acetaminophen Versus those of Infusions of Each Individual
402 Drug in Horses. J. Equine Vet. Sci., v. 64, p. 101-106, 2018.
- 403 TEIXEIRA, Renata CR et al. Effects of tramadol alone, in combination with meloxicam or
404 dipyrone, on postoperative pain and the analgesic requirement in dogs undergoing unilateral
405 mastectomy with or without ovariohysterectomy. Veterinary anaesthesia and analgesia, v. 40,
406 n. 6, p. 641-649, 2013. <https://doi.org/10.1111/vaa.12080>

407 UDEGBUNAM, Rita Ijeoma et al. Effects of two doses of tramadol on pain and some
408 biochemical parameters in rabbits post-gastrotomy. Comparative Clinical Pathology, v. 24, n.
409 4, p. 783-790, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1982-y>





7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa tese teve como objetivo traçar o perfil farmacocinético do metamizol em aplicação intravenosa isolada ou em associação ao tramadol. Com base nos resultados é possível afirmar que obteve êxito uma vez que foi possível desenvolver método analítico capaz de detectar e quantificar ambos os fármacos e seus principais metabolitos no sangue de asinino por até 48 horas. Além disso, comprovou que existem alterações em alguns parâmetros farmacocinéticos quando há administração de diferentes doses de metamizol e que as mesmas interferem no metabolismo do próprio metamizol como também tramadol e de seu metabólito mais ativo, o O-desmetiltramadol e que esses achados podem subsidiar futuros ensaios clínicos para eficácia analgésica ou mesmo estabelecer posologia adequada para jumentos.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Mossoró, 24 de julho de 2019.

PARECER 12/2019

O projeto intitulado "ANÁLISE FARMACOCINÉTICA DA DIPIRONA ISOLADA E DA SUA ASSOCIAÇÃO COM TRAMADOL EM ASININOS", sob responsabilidade de Valéria Veras de Paula, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião no dia 02 de julho de 2019, mediante resposta satisfatória ao memorando CEUA 04/2019.

<i>Vigência do projeto</i>	<i>Junho de 2019 a dezembro de 2020</i>
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Equus asinus</i>
<i>N. de Animais</i>	<i>10</i>
<i>Peso/idade</i>	<i>Adultos</i>
<i>Sexo</i>	<i>Machos e fêmeas</i>
<i>Origem</i>	<i>Animais apreendidos nas estradas do município de Mossoró-RN pelos órgãos competentes</i>

Emmanuel Rabelo
Emanuelle Fontenele Rabelo

Coordenadora CEUA-UFERSA