



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
FACULDADE DE FARMÁCIA (FF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

NEY RAMOS TOLEDO

**Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para
quantificação da ivermectina em plasma canino**

GOIÂNIA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

NEY RAMOS TOLEDO

3. Título do trabalho

Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para quantificação da ivermectina em plasma canino

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 15/08/2023, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ney Ramos Toledo, Discente**, em 26/08/2023, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3960152** e o código CRC **92B4F431**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

NEY RAMOS TOLEDO

3. Título do trabalho

Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para quantificação da ivermectina em plasma canino

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Ney Ramos Toledo, Discente**, em 22/12/2023, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4226499** e o código CRC **62796903**.

NEY RAMOS TOLEDO

**Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para
quantificação da ivermectina em plasma canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Goiás (UFG) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Linha de pesquisa: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

GOIÂNIA

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Toledo, Ney Ramos

Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para quantificação da ivermectina em plasma canino [manuscrito] / Ney Ramos Toledo. - 2023.

LXII, 62 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2023.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Farmacocinética. 2. LC-MS/MS. 3. Plasma canino. I. da Cunha, Luiz Carlos, orient. II. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata Nº **115** da sessão de Defesa de Dissertação de **NEY RAMOS TOLEDO** que confere o título de Mestre em **Ciências Farmacêuticas**, na área de concentração em **Fármacos e Medicamentos**.

Aos **dezessete dias do mês de novembro de dois mil e vinte e dois**, a partir das **08:00 horas**, na sala de defesa/4º anda da Faculdade de Farmácia, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Validação de técnica analítica em LC-MS/MS para quantificação da ivermectina em plasma canino”**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Professor Doutor Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Professora Doutora Vânia Cristina Rodriguez Salazar - (PUC/GO)**, membro titular externo e **Professora Doutora Caroline Rego Rodrigues – (UEG)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo **Professor Doutor Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG)**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **dezessete dias do mês de novembro de dois mil e vinte e dois**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Carlos Da Cunha, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2023, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vania Cristina Rodríguez Salazar, Usuário Externo**, em 30/03/2023, às 08:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caroline Rego Rodrigues, Usuário Externo**, em 30/03/2023, às 21:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3612172** e o código CRC **F7A2E7E5**.

Referência: Processo nº 23070.060755/2022-59

SEI nº 3612172

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Ney Ramos Toledo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Membros:

1. Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

2. Profa. Dra. Caroline Rego Rodrigues

3. Dr. Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto

4. Profa. Dra. Vânia Cristina Rodríguez Salazar

Data: 17/11/2022.

*Dedico esta dissertação a todos que
fizeram dessa jornada mais leve e prazerosa.*

*Em especial à minha família e amigos que
me reergueram a cada momento que cri que não
conseguiria alcançar a linha de chegada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos do laboratório NEPET que, de alguma forma, contribuíram com essa dissertação. Seja na solução de dúvidas, auxílio ao desenvolver ou uma simples conversa de descontração.

Agradecimentos, também, à Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG (EVZ/UFG) por ter permitido e auxiliado na etapa que não nos era tão familiar. Em especial, à veterinária e doutoranda (PPGCA) Luana Rodrigues Borboleta, ao Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno, à Profa. Dra. Ana Flávia Machado Botelho, ao Prof. Dr. Marco Augusto Machado Silva e ao Peão de Agropecuária da EVZ João Paulo Ferreira da Silva.

Agradecimentos especiais ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha por compartilhar tantos conhecimentos e por ter auxiliado de perto todas as etapas desta dissertação.

Agradecimentos RPGísticos a todos da Nuckturp por terem me transportado para mundos desconhecidos, empolgantes e tão necessários em alguns momentos dessa jornada.

Agradeço a todos os meus amigos de intercâmbio: Alison, Cris, Gustavo, Luiz, Luma, Marília, Ramon, Tiago e Zen, pelo companheirismo mesmo que estivéssemos tão longe.

Carinhosos agradecimentos para toda a minha família que foi meu porto seguro nesse período de tantos altos e baixos.

Agradecimentos mais que especiais à minha companheira de jornada, minha noiva, Rosângela da Silva Lima.

Por último, agradeço a todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Zoonoses de Goiânia e ao CNPq por suas inestimáveis contribuições.

Sumário

TABELAS E FIGURAS	i
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	i
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Farmacocinética da ivermectina em cães	6
3. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo geral	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. Revisão bibliográfica	20
5.2. Experimentação animal	20
5.3. Materiais	21
5.4. Métodos	22
5.5. Avaliação e determinação de perfil farmacocinético da ivermectina por LC-MS/MS.	26
6. Resultados e Discussão	28
6.1. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos	36
7. CONCLUSÃO	38
8. ANEXOS	39
8.1. Certificado de aprovação do protocolo nº. 068/20 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG).	39
9. REFERÊNCIAS	40

TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do fármaco antiparasitário ivermectina B _{1A} e B _{1B}).....	Pág. 1
Figura 2. Estruturas moleculares dos fármacos antiparasitários ivermectina e doramectina.....	Pág. 9
Figura 3. Esquema do método de extração por precipitação de proteínas seguido por extração líquido-líquido (PPT-LL).....	Pág. 23
Figura 4. Comparação estrutura molecular entre ivermectina (a) e abamectina (b), diferenças explicitadas por círculos azuis.....	Pág. 28
Figura 5. Perfil farmacocinético da ivermectina em cadela SRD após administração oral de 0,06 mg de ivermectina. Cada ponto representa a média ± DP de 2 injeções em LC-MS/MS.....	Pág. 37
Tabela 1. Parâmetros otimizados por <i>Flow Injection Analysis</i> para IVM e ABM no modo positivo.....	Pág. 24
Tabela 2. Parâmetros otimizados da análise de MRM para IVM e ABM no modo positivo.....	Pág. 24
Tabela 3. Candidatos a padrão interno para validação analítica de ivermectina.....	Pág. 28
Tabela 4. Candidatas a colunas para validação analítica de ivermectina.....	Pág. 29
Tabela 5. Candidatas a fase móvel para validação analítica de ivermectina.....	Pág. 30
Tabela 6. Testes de extração simples e exaustivas, de ivermectina, em amostras de 200 ng/mL com distintos solventes orgânicos.....	Pág. 31
Tabela 7. Amostras de CQB e CQA para avaliação do ensaio de efeito matriz.....	Pág. 33
Tabela 8. Precisão e exatidão para ivermectina em plasma canino (n=5).....	Pág. 34
Tabela 9. Resultados dos estudos de estabilidade (n=3).....	Pág. 35
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos das amostras obtidos por meio do software PKSolver.....	Pág. 37

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ABM – Abamectina

ASC ou AUC – Área sob a curva de concentração vs tempo

CE – Energia de colisão

CEUA/UFG – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás

CL – *Clearance*

$C_{m\acute{a}x}$ – Concentração máxima

COBEA – Colégio brasileiro de experimentação animal

CQA – Controle de qualidade alto

CQB – Controle de qualidade baixo

CQM – Controle de qualidade médio

CV – Coeficiente de variação

CXP – Potencial de saída

CYP450 – Citocromo P450

DP – Desvio padrão

DP – *Dessolvation Potential*

DPR – Desvio padrão relativo

EM – Efeito matriz

EP – Potencial de entrada

EPR – Erro padrão relativo

EVZ/UFG – Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

F – Biodisponibilidade

FF/UFG - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás

FIA – *Flow Injection Analysis*

FMN – Fator de matriz normalizado

HV/UFG – Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás

IVM - Ivermectina

Kel – Constante de velocidade de eliminação

LABFAR - Laboratório Multiusuário de Análises Químicas e Biológicas para Desenvolvimento e Inovação da UFG

LC-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
LD – Limite de detecção
LogP – Coeficiente de partição
LIQ – Limite inferior de quantificação
LL – Extração líquido-líquido
LSQ – Limite superior de quantificação
LQ – Limite de quantificação
MRM – *Multiple reaction monitoring*
MTBE – Éter metil terc-butílico
m/z – razão massa/carga
NEPET - Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas da UFG
pH – Potencial hidrogeniônico
PI – Padrão Interno
PPT – Precipitação de proteínas
pK_a – Constante de dissociação de ácidos
QTRAP – Triplo quadrupolo híbrido com *ion trap*
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SRD – Sem raça definida
t_{1/2} – meia-vida de eliminação plasmática
TA – Temperatura ambiente
T_{máx} – Tempo para atingir concentração máxima
Vd – Volume de distribuição

RESUMO

A ivermectina é um fármaco antiparasitário endectocida derivado da avermectina, uma lactona macrocíclica isolada do actinomiceto *Streptomyces avermectinus*. Almeja-se com esse estudo a validação de técnica analítica da ivermectina em plasma canino, com o intuito de realização de estudos farmacocinéticos, tendo em vista que ainda são necessários testes clínicos em cães para aprovação de produtos veterinários. Além disso, o método otimizado e desenvolvido neste estudo teve como objetivo possuir vantagens analíticas quanto aos já existentes. O método bioanalítico de escolha foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), utilizando uma coluna Zorbax® C18 da Agilent™ e como fase móvel 90:10 (Metanol:H₂O) com adição de 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio na fase aquosa e na fase orgânica. O padrão interno escolhido foi a abamectina devido à sua alta similaridade estrutural com a ivermectina. Ao realizar os procedimentos de validação analítica, estabeleceu-se uma curva de calibração com 7 pontos. Para os resultados de precisão e exatidão intra e inter-dia, foram injetadas triplicatas das concentrações LIQ, CQB, CQM e CQA. A precisão intra-dia teve CV na faixa 4,0 – 14,9% e a inter-dia 6,4% - 11,6%; a exatidão intra-dia teve valores na faixa 95,0 – 114,61% e a inter-dia 98,1 – 109,0%. Os estudos de estabilidade tiveram valores na faixa 88,8 – 98,2%. Todos os resultados estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela RDC ANVISA nº 27/2012. A técnica analítica foi utilizada para determinar o perfil cinético da ivermectina p.o. em uma cadela sem raça definida (SRD) de 2 anos com 14 Kg, e demonstrou ser adequado para a quantificação das variações de concentração típicas de estudos farmacocinéticos: $C_{máx} = 17,85 \text{ ng/mL}$; $T_{máx} = 1,00 \text{ h}$; $AUC_{0-inf_obs} = 2113,21 \text{ ng/mL} \cdot \text{h}$; $V_d = 41,24 \text{ L/Kg}$. O método otimizado e desenvolvido teve reduzida utilização de solventes orgânicos em seu método de extração, menor tempo de corrida analítica, menor volume de amostra utilizado e capacidade de ser aplicado em estudos farmacocinéticos.

ABSTRACT

Ivermectin is an antiparasitary drug with endectocide activity, which is derived from avermectin, a macrocyclic lactone isolated from actinomycete *Streptomyces avermectinus*. This study aims to validate a new ivermectin's analytical methodology, in dog plasma, with pharmacokinetic and bioavailability studies as objectives, regarding the still necessary clinical studies in dogs for veterinary products approval. Moreover, the optimized and developed method had as objective to have analytical benefits over the existent methods. The chosen analytical technique was High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) with a Zorbax® C18 column from Agilent™ and, as mobile phase, 90:10 (Methanol:water) with 0,1% formic acid and 5 mM ammonium formate being added to aqueous and organic phases. The internal standard of choice was abamectin due to high similarity with ivermectin. Analytical validation was performed through a calibration curve with 7. Precision and accuracy intra-day and inter-day results were obtained through triplicate concentrations of quality control samples. Intra-day precision had 4,0 – 14,9% CV values and inter-day 6,4 – 11,6%. Intra-day accuracy had values between 95,0 and 114,61% and inter-day 98,1 and 109,0%. Stability studies had values between 88,8 and 98,2%. All results agree with parameters established by RDC n°27/2012. The analytical technique was used to determine ivermectin's p.o. kinetic profile of a 2-year-old female mongrel dog weighting 14 kg, and proved adequate to quantificate typical concentration variations of pharmacokinetic data: $C_{\text{máx}} = 17,85 \text{ ng/mL}$; $T_{\text{máx}} = 1,00 \text{ h}$; $AUC_{0\text{-inf_obs}} = 2113,21 \text{ ng/mL}\cdot\text{h}$; $V_d = 41,24 \text{ L/Kg}$. The optimized and developed method had reduced use of organic solvents in its extraction method, faster analytical run, lower sample volume and can be used in pharmacokinetical studies.

1. INTRODUÇÃO

O prólogo da vasta história da ivermectina se inicia com a descoberta do micro-organismo *Streptomyces avermitilis*, atualmente nomeado como *Streptomyces avermectinus*. o qual foi isolado de amostras de solo japonesas e avaliado, juntamente com outros micro-organismos, para descoberta de novos produtos de saúde veterinários, principalmente para equinos, caprinos e bovinos (CAMPBELL, W.C. et al., 1983).

Após análise de diversos actinomicetos descobriu-se, no anteriormente citado, uma lactona macrocíclica de 16 membros: a avermectina. Após aprimoramento dessa estrutura chegou-se à ivermectina, o derivado mais potente e seguro. Este derivado 22,23-diiidro da avermectina é caracterizado, em sua forma comercial, por ser uma mistura entre as formas B_{1A} e B_{1B} (Figura 1), as quais por serem moléculas apenas ligeiramente diferentes pode-se considerar que ambas são equipotentes (GWALTNEY-BRANT; DECLEMENTI; GUPTA, 2018; OMURA, S.; 2007).. Ademais, na década de 80, sua atividade antiparasitária foi inédita, sendo ativa contra helmintos, aracnídeos, insetos e considerado o primeiro endectocida – efeito em ecto e endoparasitas (CAMPBELL, W.C. et al., 1983;).

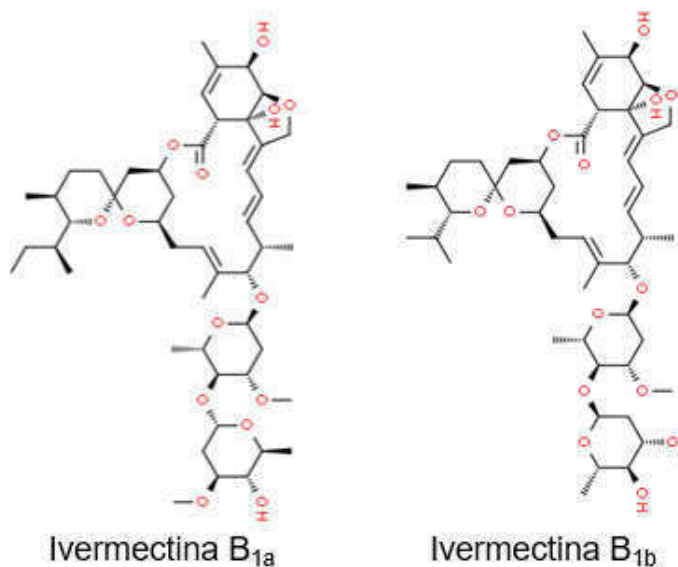


Figura 1. Estrutura molecular do fármaco antiparasitário ivermectina B_{1a} e B_{1b}.

Além disso, a farmacodinâmica desse fármaco se caracteriza pela potenciação dos canais de íons cloreto com ativação glutamaérgica. Estes canais fazem parte da família Cys-loop de canais de cloro ligante dependentes que também contêm como membros os ativados por ácido gama-aminobutírico (GABA), histamina e sensíveis a pH. Ao se ligar nos canais glutamaérgicos, principal alvo em parasitas, a ivermectina causa uma reação neurotóxica que leva à paralisia e morte dos alvos biológicos e, nas doses normalmente utilizadas, não afeta mamíferos devido à ação protetora da P-glicoproteína presente no sistema nervoso central dessa classe de seres vivos (CHACCOUR; HAMMANN; RABINOVICH, 2017; EDWARDS, 2003; PAPICH, 2016).

A ivermectina possui diversas vias de administração – cada uma com o seu respectivo regime posológico. O medicamento comercial Top Dog® é de administração oral com regime posológico de dose única (0,06 mg/kg) (TOP DOG, 2019).

Produtos contendo ivermectina são utilizados em diversos animais, incluindo os cães, que são classificados cientificamente como pertencentes à classe dos mamíferos, ordem dos carnívoros, subordem caniformia, família dos canídeos, gênero *Canis*, espécie *Canis lupus* e subespécie *Canis lupus familiaris*. São animais bem diversos quanto a raças – aproximadamente 400 – que variam drasticamente em tamanho e forma. Já foram muito utilizados em pesquisas por constituírem uma espécie que se relaciona muito bem com os humanos, porém o número de pesquisas com cachorros a fim de testar produtos para consumo humano caíram drasticamente (NEMZEK et al., 2015).

Todavia, os cães ainda são utilizados para testes clínicos de produtos para uso veterinário. Sabendo disso, é relevante ressaltar que uma dessas áreas de pesquisa é a relacionada com o tratamento de endo e (ou) ectoparasitas utilizando a ivermectina (DANAHER et al., 2006; FOX, 2006; GONZÁLEZ-CANGA et al., 2009; MCKELLAR; GOKBULUT, 2012).

Porém, o estudo farmacocinético em cães ainda é bem escasso, sendo encontrados mais estudos para outras espécies animais, tais como bovinos,

suínos, equinos e caprinos (DANAHER et al., 2006; FOX, 2006; GONZÁLEZ-CANGA et al., 2009; MCKELLAR; GOKBULUT, 2012).

A ivermectina é amplamente utilizada em cães tanto para o tratamento de endo quanto de ectoparasitas. Alguns dos endoparasitas que acometem os cães são: *Dirofilaria immitis* (Dirofilariose ou parasita do coração do cão), *Dipetalonema recondium* (filariose canina), *Toxocara canis* (toxocaríase), *Toxascaris leonina* (toxocaríase), *Ancylostoma caninum* (ancilostomose canina), *Uncinaria stenocephala* (ancilostomídeo do norte dos cães), *Strongyloides stercoralis* (estrongiloidíase ou estrongiloidose), *Filaroides osleri* (verme do pulmão do cão), *Capillaria* spp (vermes capilares) e *Trichuris vulpis* (verme chicote). Enquanto os ectoparasitas que podem ser encontrados nos cães são: *Sarcoptes scabiei* (sarna sarcóptica), *Demodex canis* (sarna demodécica canina, demodécicose, sarna negra, sarna folicular, sarna vermelha ou lepra canina), *Otodectes cynotis* (sarna otodécica ou notoédrica), *Ctenocephalides canis* (pulga do cão) e *Ctenocephalides cati* (pulga do gato) (CAMPBELL, 1989).

Durante o desenvolvimento de estudos farmacocinéticos, os métodos bioanalíticos são fundamentais para a quantificação de um fármaco, como por exemplo a ivermectina, visto que, pode ser realizado através de diferentes matrizes de amostras. A principal técnica bioanalítica utilizada para a quantificação da ivermectina é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Essa técnica possui alta sensibilidade, rapidez e seletividade, principalmente quando está relacionada ao processo de validação analítica (DUTHALER et al., 2019).

A farmacocinética é o estudo de como um fármaco entra, distribui-se, transforma-se e é excretado pelo corpo (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014). Por outro lado, estuda também a variação da concentração de um fármaco durante o caminho que percorre em organismos vivos em função do tempo (RANG et al., 2016^b).

A absorção é o primeiro estágio que o fármaco precisa passar para que consiga alcançar e, conseqüentemente, interagir com o seu respectivo

receptor. Nessa fase o fármaco entra em contato com o tecido dérmico ou área que contenha mucosa para que consiga adentrar na corrente sanguínea (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014).

Os principais meios de atingir a corrente sanguínea são através das vias de administração de fármacos: oral (via que é abordada neste trabalho), cutânea, retal, pulmonar e endovenosa (RANG et al., 2016^a). A administração oral é a via mais utilizada por ser naturalmente desenvolvida para tal função e não invasiva. Entretanto, essa opção apresenta alguns parâmetros (presença de alimentos ou jejum, pH, pK_a, logP, forma ionizada ou molecular, tamanho de partícula, forma farmacêutica, fluxo sanguíneo, solubilidade) que influenciam aumentando ou reduzindo a chegada ao tecido sanguíneo (STORPIRTIS et al., 1999).

Ademais, outra via bastante utilizada e não invasiva é a via cutânea, no entanto possui fatores limitantes mais difíceis de contornar, se comparado com a via oral, tais como: espessura do tecido cutâneo, temperatura, grau de hidratação epitelial, concentração de lipídeos, número de folículos pilosos, ação de glândulas sudoríparas e integridade do estrato córneo (SILVA et al., 2010).

Por outro lado, a etapa de distribuição – desempenhada principalmente pela corrente sanguínea – é encarregada de transportar a quantidade de fármaco absorvida aos mais variados tecidos. No caso dessa etapa, os obstáculos mais rotineiros são amplitude de volume de distribuição (V_d), ligação às proteínas plasmáticas (albumina e α_1 -glicoproteína ácida) e barreiras biológicas (OGA; FARSKY; MARCOURAKIS, 2014).

Por último, a eliminação de fármacos que abarca os processos de metabolismo e excreção (as principais vias deste são urinária, fecal/biliar e pulmonar), sendo que o parâmetro mais representativo é o *clearance* (CL), calculado da relação entre taxa de eliminação e concentração do fármaco (HOLFORD, 2018).

Ainda, caso desejado, pode-se especificar qual órgão realizou o *clearance*. Ou seja, caso o responsável pela excreção seja o rim, fígado ou pulmão a abreviação ficaria CL_{rim}, CL_{fígado} ou CL_{pulmão}, respectivamente.

Portanto, depende do local e do modo que a concentração é mensurada (HOLFORD, 2018).

O metabolismo - ou biotransformação - encarrega-se de tornar esses fármacos em substâncias com maior polaridade a fim de que sejam facilmente excretados e reduzam a toxicidade, na maioria das vezes, ou aumentem em alguns casos. A superfamília de enzimas do citocromo P450 (CYP450) é uma das mais importantes nessa etapa de biotransformação. Além disso, esse estágio pode ser dividido em dois tipos de reação: reações de fase I e de fase II. As reações de fase I são incumbidas dos processos de oxidação, redução e hidrólise, por outro lado as de fase II são representadas por mecanismos de conjugação molecular (NUNES, 2015).

Portanto, um novo método bioanalítico é essencial no âmbito dos estudos de ivermectina em cães. Uma vez que, nas poucas opções disponíveis na literatura, os métodos possuem alta utilização de solventes orgânicos, tempo de corrida longo e (ou) utilizam um alto volume de amostra. Logo, este trabalho se justifica por haver a necessidade de métodos analíticos com reduzida utilização de solventes orgânicos em sua etapa de extração, menor tempo de corrida, menor volume de amostra e, principalmente, ser capaz de ser aplicado em estudos farmacocinéticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Farmacocinética da ivermectina em cães

Lo e colaboradores (1985) avaliaram os efeitos de formulação, espécie animal e rota de administração nas curvas de concentração plasmática x tempo. Para isso, administraram, por via endovenosa, 4 mg/mL (dose de 200 µg/kg) de uma formulação micelar aquosa de ivermectina para cães sem raça definida (SRD), adotaram o modelo bicompartimental e o método bioanalítico de HPLC com detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos foram: $t_{1/2\beta}$ (1,8 dia) e V_d (2,4 L/kg).

Este estudo é, ainda, importante porque determinou a solubilidade da ivermectina em alguns solventes orgânicos e em plasma, as taxas de distribuição para dimensionar a absorção gastrointestinal e correlacionou o efeito da formulação em parâmetros farmacocinéticos. Todavia, a maior parte desse estudo foi focada em analisar parâmetros farmacocinéticos de gado. É um ponto negativo, pois é o único estudo que avalia a farmacocinética por via endovenosa em cães e a AUC não foi calculada para essa espécie. Teria sido interessante esse parâmetro farmacocinético ter sido avaliado, visto que a biodisponibilidade da ivermectina em cães estaria determinada e o cálculo, por exemplo, de CL/F e V_d/F de vários estudos que foram publicados posteriormente deixaria de ser suposições baseadas em dados que tentam suplantam essa lacuna.

O estudo de Kojima et al. (1987^a) avaliou a biodisponibilidade de dois tipos de comprimido (com 23 e 46 µg de ivermectina, concentração total de 276 µg) e a farmacocinética da ivermectina, por intermédio de equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FL). Além disso, adotou-se o modelo bicompartimental para apresentar os dados de meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) – $31,1 \pm 6,67$ e $33,8 \pm 6,33$ h; concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) – $17,24 \pm 1,42$ e $16,67 \pm 0,91$ ng/mL; tempo necessário para atingir $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$) – $2,30 \pm 0,21$ e $2,70 \pm 0,30$ - e área sob a curva de concentração x tempo (AUC) – $262,5 \pm 21,9$ e $253,3 \pm 18,4$ ngh/mL - para comprimidos com 23 e 46 µg de ivermectina, respectivamente.

Esse artigo, apesar de ter delineado satisfatoriamente as etapas analítica, estatística e farmacocinética, não detalhou como foi feita a administração dos comprimidos para os cães, nem citou se foi submetido a um comitê de ética. É importante ressaltar esses fatores, porque os autores na maior parte da escrita relatam somente a concentração de ivermectina nos referidos comprimidos (23 e 46 µg), todavia na última sentença afirma que foi administrada uma concentração total de 276 µg. Essa afirmação leva a crer que os autores administraram concomitantemente 6 comprimidos, concentração de 46 µg, ou 12 comprimidos, concentração de 23 µg. Entretanto, não especificaram como esse processo foi feito. Possivelmente, a administração foi feita com 60 mL de água, assim como no artigo (KOJIMA, K. et al., 1987^b) – desenvolvido pelos mesmos autores - que demonstra o método bioanalítico desenvolvido para quantificar a ivermectina. Quanto à não citação de submissão a um comitê de ética, é plausível cogitar que foi devido à reduzida vigilância no uso de animais em pesquisas quando o estudo foi realizado.

Para mais, os estudos de Clark et al. (1992) e Daurio et al. (1992) são estudos complementares no âmbito de tipos de comprimidos a serem administrados aos cães e se a adição de um sal insolúvel (pamoato de pirantel) influenciaria na farmacocinética da ivermectina. Ambos os estudos utilizaram um espectrômetro de cintilação para medir seus dados. O segundo comparou a biodisponibilidade de comprimidos mastigáveis e não-mastigáveis (dose de 6 µg/kg) e entre comprimidos normais e modificados (dose de 100 µg/kg), enquanto o primeiro (dose de 6 µg/kg) avaliou a bioequivalência entre comprimidos mastigáveis contendo somente ivermectina e outros contendo ivermectina e pamoato de pirantel. A pesquisa de Clark, J.N. et al. (1992) gerou os seguintes números: 2,45 ngEq/g ($C_{máx}$), 5,20 h ($T_{máx}$) e 70,60 ngh/g (AUC). Enquanto Daurio et al. (1992) chegou em 2,97 e 3,37 ng/g ($C_{máx}$); 5,33 e 8,51 h ($T_{máx}$); e 107,32 e 130,89 ngh/g (AUC) para, respectivamente, comprimidos e comprimidos mastigáveis. Já para os comprimidos e comprimidos modificados, respectivamente, obtiveram: 44,313 e 48,375 ng/g ($C_{máx}$); 4,22 e 3,75 h ($T_{máx}$); e 1035,09 e 1000,50 ngh/g (AUC).

A conclusão do artigo de Clark et al. (1992) é que a adição de sal insolúvel, apesar de um ligeiro aumento em $T_{máx}$, não afeta a farmacocinética da ivermectina, haja vista que o medicamento é preconizado para administração a cada 30 dias.

O estudo de Daurio, C.P. et al. (1992), apesar de terem conseguido comprovar a bioequivalência entre comprimidos e comprimidos modificados, não explica como foi feita a forma cristalizada da ivermectina utilizada nestes, nem a estrutura dessa forma cristalizada. Além disso, relatam ter utilizado o método bioanalítico de HPLC-FL desenvolvido por Kojima, K. et al. (1987) e Stong (1987) para determinar a quantidade de ivermectina nas amostras de plasma canino. Porém, todos os resultados são relatados como se adquiridos, exclusivamente, por intermédio de espectrômetro de cintilação.

Já em Gokbulut, C. et al. (2006), o objetivo era comparar níveis plasmáticos de ivermectina e doramectina - dose de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para ambas - após administração oral em cães sem raça definida (SRD). O modelo compartimental adotado foi o não-compartimental e o método bioanalítico HPLC-FL. Os parâmetros encontrados foram: $3,32 \pm 1,56$ dias ($t_{1/2\beta}$), $116,80 \pm 10,79$ ng/mL ($C_{máx}$), $0,23 \pm 0,09$ ($T_{máx}$), $236,79 \pm 41,45$ ngdia/mL (AUC) e $4,35 \pm 1,78$ dias para o tempo de residência médio (MRT). Além do estudo por via oral, também compararam o perfil farmacocinético da ivermectina e da doramectina por via subcutânea através de uma injeção de solução injetável com dose de $200\mu\text{g}/\text{kg}$ em cães SRD. O modelo compartimental adotado foi o não-compartimental e o método bioanalítico HPLC-FL. Os parâmetros determinados foram: $t_{1/2\beta}$ ($3,19 \pm 0,95$ dia), $C_{máx}$ ($66,80 \pm 9,67$ ng/mL), $T_{máx}$ ($1,40 \pm 1,00$ dia), AUC ($349,18 \pm 47,79$ ngdia/mL) e MRT ($5,32 \pm 1,26$ dia).

Os resultados desse estudo comprovaram que os valores de $C_{máx}$ são diretamente proporcionais aos valores das doses administradas, além de indicarem uma maior $C_{máx}$ e uma absorção mais lenta de ivermectina – comparando-se com valores de doramectina. Ademais, comparando-se com os valores de administração subcutânea obtidos no mesmo estudo (resultados subcutâneos estão relatados na seção “Farmacocinética de formulações subcutâneas e endovenosa”), os valores da via subcutânea

(SC) resultaram em uma $C_{m\acute{a}x}$ menor, AUC maior e – como esperado – uma absorção mais lenta, enquanto não foram observadas diferenças significativas (comparando-se ivermectina oral e subcutânea, ivermectina oral e doramectina oral, ivermectina oral e doramectina subcutânea e doramectina oral e subcutânea) nos parâmetros $t_{1/2\beta}$ e MRT.

Essas diferenças encontradas nos parâmetros farmacocinéticos podem ser atribuídas às diferenças na estrutura molecular dos fármacos (Figura 2) (TOUTAIN, P.L. et al., 1997), às diferentes composições das formulações (LO, P.A. et al., 1985) ou devidas a precipitação de fármaco no local da administração subcutânea (SCOTT, E.W., MCKELLAR, Q.A., 1992).

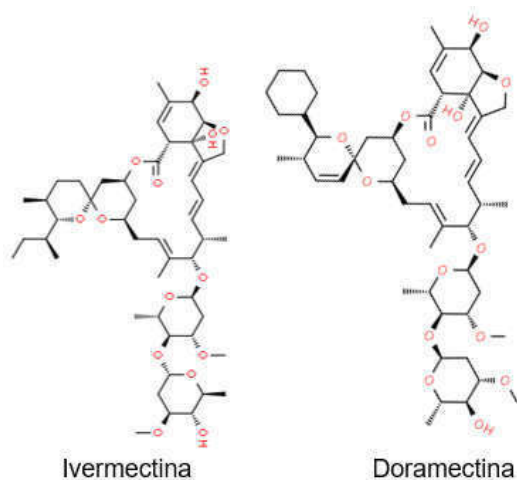


Figura 2. Estruturas moleculares dos fármacos antiparasitários ivermectina e doramectina.

Clark, S.L. e colaboradores (2004), por outro lado, verificaram se era viável o uso de uma matriz biodegradável para distribuição da ivermectina. Para tanto, realizaram uma administração subcutânea (dose de 0,5 mg/kg) de ivermectina contida em micropartículas de poliácido(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), em beagles, contendo 25%, 32,5%, 35% e 50% de peso de ivermectina. O modelo farmacocinético adotado não foi especificado e o método bioanalítico foi HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: $C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL) – $8,40 \pm 3,57$; $3,40 \pm 1,27$; $7,20 \pm 4,44$; e $3,90 \pm 1,33$; $T_{m\acute{a}x}$ (dia) – $228,00 \pm 33,20$; $169,00 \pm 99,00$; $174,00 \pm 87,60$; e $1,00 \pm 0,00$; e AUC (ngdia/mL) – $410,00 \pm 118,80$; $375,00 \pm 106,40$; $400,00 \pm$

98,40; e $330,00 \pm 67,70$ para, respectivamente, as micropartículas com 25%, 32,5%, 35% e 50% de ivermectina.

Todas as formulações produzidas pelos autores conseguiram 100% de eficácia no controle do desenvolvimento de adultos de *Dirofilaria immitis* (mesmo se não foi possível detectar a concentração da formulação no momento da infecção). Apesar disso, recomendaram o uso da formulação com 32,5% e 50% por terem tido um perfil farmacocinético mais homogêneo.

Cunningham e colaboradores (2006) avaliaram o uso de implantes de silicone em forma de hastes, revestidos, que continha ivermectina a fim de prevenir a infecção de cães com *Dirofilaria immitis*. O método bioanalítico de escolha foi o HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos relatados para dois tipos de implantes (E e F), em um período de estudo de 57 semanas para os tamanhos de 12 mm, 18 mm, 24 mm e 30 mm, foram: $C_{\text{máx}}$ (ng/mL) – $2,85 \pm 1,5$; $2,58 \pm 1,1$; $2,90 \pm 0,50$; $3,90 \pm 1,70$ e $3,50 \pm 1,50$; $2,45 \pm 1,70$; $2,58 \pm 1,10$; $3,53 \pm 0,70$; AUC (ng*semana/mL) – $60,5 \pm 6,70$; $71,30 \pm 20,90$; $87,50 \pm 14,70$; $115,20 \pm 34,60$ e $61,00 \pm 9,70$; $48,90 \pm 39,30$; $61,10 \pm 22,50$; $73,50 \pm 28,20$.

O referido estudo obteve êxito em desenvolver um produto que tivesse sucesso em prevenir a infecção dos cães pela *D. immitis* por até 12 meses, resolvendo o problema de os donos darem continuidade ao tratamento neste longo período. Todavia, os autores - ao afirmarem que a ivermectina é muito estável frente a ciclos de congelamento e descongelamento - não referenciaram ou relataram dados comprovando o mesmo.

Outro ponto a se destacar é a não padronização na escolha dos cães para os estudos pré-clínico, clínico e de campo, pois em alguns destes foram usados cães beagle, cocker spaniels, cães de caça e (ou) SRD com ampla faixa de peso. Não havendo explicação do porquê terem escolhido essas raças para um estudo e para o outro não. Ao separar esses cães em grupos foi feita uma separação aleatória, podendo haver, por exemplo, grupos com mais cães cocker spaniel e com grande diferença de pesos. Logo, a comparação entre os grupos pode não ser confiável devido à padronização pobre. Esses fatores são importantes, pois há diferença entre a farmacocinética de diferentes raças de cães com pesos distintos, como já

discutido anteriormente. Dessa maneira, os dados farmacocinéticos encontrados podem estar enviesados devido a esses fatores.

Vamathevan, J.J. et al. (2013) dizem que beagles são amplamente utilizados em estudos farmacológicos devido a uma mutação na enzima CYP1A2. Da mesma maneira, Denny et al. (2017) relatam que os beagles são cães de manuseio mais simples, há possibilidades de várias rotas de administração e facilidade em acomodá-los em conjunto.

Outro fator que não foi esclarecido foi a razão de terem utilizado 10 implantes em cada cão no estudo pré-clínico 1, a concentração utilizada nos mesmos e não foi relatado em que parte do cão foram colocados esses implantes. Ainda, no estudo pré-clínico 2 foram utilizados implantes de diferentes tamanhos, não sendo especificado qual cão recebeu o implante de maior ou menor tamanho e no estudo pré-clínico 3 não relataram como foi o processo para escolher a concentração de 7,3 mg de ivermectina. Além disso, não padronizaram a unidade de tempo, às vezes relatando resultados em dias, outras em semanas ou meses, dificultando a análise dos resultados do estudo.

Por último, a concentração plasmática que utilizam como base para ratificar os resultados deles foi a de Daurio et al. (1992). Porém, ao relatarem os valores converteram as unidades contidas no estudo destes autores de ng/g para ng/mL.

O ensaio de Al-Azzam et al. (2007) foi dedicado à comparação entre a farmacocinética da ivermectina e da moxidectina após administração de uma dose oral de 250 µg/kg, em cães beagle, para tratamento de uma infecção experimental com *Brugia pahangi*. Posteriormente à análise em HPLC-FL, calcularam os valores: 80,3 ± 29,8 h e 76,0 ± 16,3 h ($t_{1/2\beta}$); 132,6 ± 46,0 ng/mL e 122,6 ± 38,6 ng/mL ($C_{\text{máx}}$); 4,12 ± 1,43 h e 3,65 ± 1,18 h ($T_{\text{máx}}$); 5,6 ± 1,8 µgh/mL e 5,4 ± 1,7 µgh/mL (AUC); - 98,4 ± 25,6 h (MRT); - 5,35 ± 1,29 l/kg e 4,79 ± 0,49 l/kg para volume de distribuição em steady-state ($V_{d_{ss}}/F$); e 0,0498 ± 0,0179 l/h/kg e 0,0519 ± 0,0193 l/h/kg para clearance corporal total (CL/F), considerando o modelo não-compartimental e bicompartimental, respectivamente (o parâmetro MRT foi calculado apenas para o modelo não-compartimental).

O estudo recém mencionado não encontrou diferenças estatísticas significativas para CL/F , Vd_{ss}/F e $t_{1/2\beta}$ ao analisarem prováveis diferenças que poderiam ser ocasionadas pelo sexo. Da mesma forma, os valores encontrados suportam as características de rápida absorção, de extensa distribuição tecidual - principalmente para tecido adiposo – e corroboram a longa permanência corporal desses fármacos em cães. Porém, na seção de materiais e métodos, disseram que realizaram um estudo de eficácia através da infecção experimental com *Brugia pahangi* e posterior contagem destes parasitas. Todavia, não relataram – nem discutiram - nenhum resultado de eficácia; apenas de farmacocinética.

Hugnet, C. e colaboradores (2007) investigaram quais seriam os efeitos de múltiplas administrações de cetoconazol na farmacocinética da ivermectina que foi administrada por via subcutânea. Para tal fim, administraram uma solução injetável - dose de 0,5 mg/kg - de ivermectina pela referida via em cães Beagle. Adotaram o modelo não-compartimental e realizaram as análises por meio de HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos medidos foram: $t_{1/2\beta}$ ($2,12 \pm 0,20$ dia), $C_{máx}$ ($11,59 \pm 3,02$ ng/mL), $T_{máx}$ ($1,42 \pm 0,72$ dia), AUC ($50,13 \pm 7,03$ ngdia/mL), MRT ($3,84 \pm 0,81$ dia) e Cl/F (974 ± 136 mL/diakg).

Análises dos resultados desse estudo indicaram elevação nos parâmetros de exposição e decréscimo em parâmetros de eliminação da ivermectina. Logo, pode-se afirmar que há interação entre ivermectina e cetoconazol e que tal interação acontece via inibição do processo de eliminação. Essa inibição, segundo os autores, possivelmente está relacionada à função da P-gp (cetoconazol interfere na função dessa glicoproteína). Portanto, o clínico deve adotar meios para precaver altos níveis de exposição à ivermectina devido a uma interação com medicamentos que modificam a função da P-gp.

Eraslan, G. e colaboradores (2010) avaliaram 7 (sete) distintas formulações comerciais, e consequentemente divididos em 7 (sete) grupos (A a G), de ivermectina subcutânea com a mesma dose (200 μ g/kg) em cães SRD. O modelo farmacocinético de escolha foi o bicompartimental e o método bioanalítico HPLC-FL. Os parâmetros analisados foram: $t_{1/2\beta}$ (h) – A, $109,05 \pm 26,01$; B, $104,75 \pm 9,05$; C, $130,89 \pm 39,69$; D, $111,79 \pm 30,34$; E,

145,99 ± 47,81; F, 103,23 ± 28,28; G, 116,74 ± 32,79; C_{máx} (ng/mL) – A, 49,69 ± 9,23; B, 36,17 ± 10,08; C, 29,12 ± 10,32; D, 31,54 ± 8,81; E, 30,44 ± 6,99; F, 42,46 ± 14,81; G, 26,50 ± 5,35; T_{máx} (h) – A, 32,57 ± 7,63; B, 34,28 ± 6,67; C, 31,71 ± 8,97; D, 33,42 ± 4,72; E, 30,85 ± 8,78; F, 32,57 ± 8,38; G, 34,28 ± 2,92; AUC (ngh/mL) - A, 5980,09 ± 1960,11; B, 4464,84 ± 1575,22; C, 3404,87 ± 1065,15; D, 3531,59 ± 1315,29; E, 4503,86 ± 1907,93; F, 3425,74 ± 1327,55; G, 3073,88 ± 555,26; e MRT (h) – A, 160,99 ± 42,16; B, 157,31 ± 12,68; C, 183,73 ± 58,05; D, 164,51 ± 52,29; E, 209,18 ± 71,01; F, 137,95 ± 33,42; G, 174,97 ± 51,62.

Com os resultados obtidos, os autores concluíram que a absorção, distribuição e eliminação da ivermectina é baixa devido à característica lipofílica do fármaco, alta ligação a proteínas plasmáticas e acumulação no tecido adiposo. Logo, a partir dessas conclusões, relataram que a difusão do compartimento central para o periférico é rápida, do periférico para o central é lenta e MRT e T_{1/2β} são longos. Do mesmo modo, ressalta-se que este estudo foi pioneiro em informar as taxas de difusão entre compartimentos, comprovando que o modelo exercido pela ivermectina é o bicompartimental.

Dunn e colaboradores (2011) testaram se o uso concomitante de ivermectina e espinosade em cães gerava uma maior inibição da glicoproteína-P (P-gp) por meio de estudos farmacocinéticos e experimentos *in vitro* de inibição e de efluxo de P-gp. Na seção de estudos farmacocinéticos, os autores adotaram o modelo não-compartimental e administraram - por via oral - uma solução injetável comercial (dose de 60 µg/kg) em cães beagle. O método bioanalítico selecionado foi o HPLC-FL e os parâmetros obtidos foram: 106 ± 33 h (t_{1/2β}); 24,0 ± 6,6 ng/mL (C_{máx}); 5,3 ± 4,0 h (T_{máx}); 934,00 ± 241,00 ngh/mL (AUC); e 67,3 ± 15,1 mL/hkg (CL/F).

Os resultados de inibição *in vitro* da ivermectina e do espinosade demonstraram que ambos despolarizaram o efluxo mediado por P-gp (deixando-a não funcional), porém ainda que tenham conseguido bons resultados de inibição *in vitro* realizaram estudos em cães. Após análise dos resultados *in vivo* chegaram a dados que levam a acreditar em uma interação por intermédio de um modelo de inibição de secreção. Todavia, como ressaltado pelos autores, existem alguns fatores que impedem de

afirmar categoricamente a causa dos efeitos provenientes da interação entre ivermectina e espinosade.

Sob outra perspectiva, Walther e colaboradores (2015) analisaram o perfil farmacocinético da ivermectina em cães. Esses pesquisadores fizeram uma administração concomitante de ivermectina e fluralaner para checar se essa associação aumentava a probabilidade da neurotoxicidade da ivermectina. Os animais utilizados foram cães saudáveis da raça beagle que receberam uma solução injetável, dose de 0,3 mg/kg, por via oral. O modelo compartimental utilizado para interpretação das análises foi o não-compartimental, não foi mencionado método bioanalítico utilizado – no entanto – pode-se afirmar que foi um método cromatográfico, porque relataram um limite inferior de quantificação (LIQ) de 1 ng/mL. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: $2,07 \pm 0,71$ dias ($t_{1/2\beta}$); $92,70 \pm 26,77$ ng/mL ($C_{\text{máx}}$); $0,29 \pm 0,10$ dia ($T_{\text{máx}}$) e $141,96 \pm 27,23$ ngdia/mL (AUC).

Nesse estudo, houve a conclusão de que a referida administração concomitante não eleva o risco de neurotoxicidade. Entretanto, os autores não realizaram nenhum teste com a glicoproteína-P (P-gp) – proteína de efluxo transmembrana encontrada na barreira hematoencefálica - principal responsável pela neurotoxicidade em cães (MEALEY, 2004).

A relevância – para a farmacocinética da ivermectina em cães - dessa glicoproteína é por causa de a ivermectina ser a sua entrada no sistema nervoso central bastante prejudicada por ela (MEALEY, 2004). Ou seja, caso a P-gp tenha sua função comprometida poderá ocorrer neurotoxicidade - ocorrência detectada em cães da raça Collie quando há uma mutação (inserção ou deleção) no gene ABCB1 (EDWARDS , 2003; HAN et al., 2010; MEROLA e EUBIG, 2012; ZHU et al., 2014; MEROLA et al., 2018). Logo, afirmar que o risco da administração concomitante não causou elevada neurotoxicidade somente avaliando alguns parâmetros farmacocinéticos em Beagles pode ser equivocada.

Geng e colaboradores (2016) desenvolveram uma formulação formadora de gel *in situ*, composta de uma matriz de ácido isobutirato-polilático de acetato de sucrose (SAIB-PLA), ao realizar administração subcutânea (dose de 4 mg/kg). Essa nova formulação foi planejada a fim de

e elevar o tempo de liberação e reduzir a liberação repentina e abrupta que ocorre em géis SAIB; para isso compararam com uma solução injetável subcutânea comercial (dose de 0,5 mg/kg). Para essa análise, utilizaram o modelo farmacocinético não-compartimental e o método cromatográfico HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: $t_{1/2\beta}$ – $24,37 \pm 1,71$ e $4,80 \pm 1,04$ dia; $C_{\text{máx}}$ – $182,93 \pm 26,47$ e $149,54 \pm 15,33$ ng/mL; $T_{\text{máx}}$ – $4,83 \pm 2,48$ e $2,00 \pm 0,00$ dia; AUC – $5383,12 \pm 241,97$ e $772,89 \pm 44,48$ ngdia/mL; e MRT – $32,86 \pm 0,91$ e $7,24 \pm 0,69$ – para a solução injetável formadora de gel in situ e para a comercial, respectivamente.

Os autores criaram uma formulação otimizada de gel SAIB-PLA que possuísse um perfil de liberação prolongado e controlado, evitando os efeitos de liberação repentinos e abruptos observados em géis SAIB, e conseguiram manter concentrações de pelo menos 1 ng/mL por 110-120 dias. Essa concentração, baseando-se nos estudos de Geary, T.G. et al. (1993) e de Gill, J.H. e Lacey, E. (1998), seria suficiente para atingir atividade antiparasitária in vivo. Essa é uma importante conclusão, visto que ficou estabelecido uma concentração alvo para ser atingida em estudos de farmacocinética utilizando a ivermectina.

Em contrapartida, Magalhães, V.S. e colaboradores (2016) avaliaram a farmacocinética e a eficácia da ivermectina frente à infecção artificial de *Ctenocephalides felis felis* (pulgas) e *Rhipicephalus sanguineus* (carrapatos). Para o desenvolvimento desse estudo, um comprimido com dose de 0,6 mg/kg foi administrado a cães beagle por via oral. Utilizou-se o modelo não-compartimental e o método bioanalítico HPLC-FL. Os parâmetros calculados foram: $47,1 \pm 22,8$ h ($t_{1/2\beta}$), $350,70 \pm 84,10$ ng/mL ($C_{\text{máx}}$), $4,0 \pm 0,00$ h ($T_{\text{máx}}$), $8490,70 \pm 2599,90$ ngh/mL (AUC) e $8,819 \pm 3,381$ l/kg (volume de distribuição, V_d).

Ao analisar os resultados os autores encontraram indícios de que o modelo compartimental da ivermectina é o bicompartimental e o valor de AUC encontrado foi maior que em formulação por via SC (ERASLAN, G. et al., 2010), $T_{1/2\beta}$ menor que por via SC (TAYLOR, M.A., 2001), ivermectina possuir baixa efetividade em *Ctenocephalides felis felis* e em estudos in vitro (ZAKSON-AIKEN, M. et al., 2001), além de a selamectina conseguir penetrar melhor no cérebro dos parasitas do que a ivermectina (PHIPPS, A.N., 2005).

Porém, no estudo de Magalhães, V.S. e colaboradores (2016), os autores poderiam ter utilizado *Ctenocephalides canis* para obterem resultados mais confiáveis, haja vista que *Ctenocephalides felis felis* não gera tanta prole em cães quanto em gatos (DURDEN, L.A., 2019) e, ainda, não explicam o que seriam o termo “séries”, não relataram valores de $T_{1/2\beta}$ rápida e lenta para comprovar os indícios de modelo bicompartimental.

Genchi, M. e colaboradores (2017) criaram um protótipo de implante subcutâneo de ivermectina para prevenção de *Dirofilaria immitis* (estágios larvais L3 e L4) e avaliaram a eficácia e segurança do mesmo em 6 (seis) cães Beagle. As doses, em mg/kg, utilizadas nesses cães foram distintas, sendo $dose_{c\tilde{a}o1} = 0,31$; $dose_{c\tilde{a}o2} = 0,29$; $dose_{c\tilde{a}o3} = 0,42$; $dose_{c\tilde{a}o4} = 0,49$; $dose_{c\tilde{a}o5} = 0,58$; e $dose_{c\tilde{a}o6} = 0,63$. O modelo farmacocinético adotado não foi especificado e o método bioanalítico utilizado foi HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: $t_{1/2\beta}$ (dia) – cão1, 59; cão2, 119; cão3, 154; cão4, 251; cão5, 102; cão6, 91; $C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL) – cão1, 7,63; cão2, 8,85; cão3, 5,02; cão4, 6,93; cão5, 6,25; cão6, 3,50; $T_{m\acute{a}x}$ (dia) - cão1, 1,00; cão2, 2,00; cão3, 1,00; cão4, 1,00; cão5, 1,00; cão6, 1,00; e AUC (ngdia/mL) - cão1, 242,84; cão2, 219,90; cão3, 185,24; cão4, 212,28; cão5, 199,16; cão6, 131,97.

Os autores desse estudo conseguiram valores mínimos de concentração efetivos que ratificaram a menor concentração encontrada (0,15 ng/mL) por Cunningham, C.P. et al. (2016) para atingir proteção contra *D. immitis* em seu estágio larval L3. Outrossim, relataram que a efetividade da ivermectina contra esse parasita - que entra rapidamente em tecidos do hospedeiro – é devido às maiores concentrações de ivermectina em tecidos (exceto cérebro, devido à presença da P-gp) do que no sangue.

Por último, Ozdemir, Z. e colaboradores (2019) investigaram se havia interação farmacocinética entre ivermectina e praziquantel após administração oral de comprimido (dose de 0,4 mg/kg) para cães SRD saudáveis. O modelo adotado foi, também, o não-compartimental e o método bioanalítico HPLC-FL. Os parâmetros farmacocinéticos calculados foram: $110 \pm 11,06$ h ($t_{1/2\beta}$), $137,00 \pm 48,09$ ng/mL ($C_{m\acute{a}x}$), $14,00 \pm 4,90$ h ($T_{m\acute{a}x}$), $7,805 \pm 1,768$ ngh/mL (AUC), $101,00 \pm 26,71$ h (MRT), $8,819 \pm 3,381$ mL/kg (volume de distribuição aparente, V_d/F) e $54,45 \pm 17,24$ mL/hkg (Cl/F).

Neste estudo, os autores discutiram que, ao comparar interações farmacocinéticas e farmacodinâmicas de combinações de fármacos, a raça e a espécie dos animais deve ser considerada, porque diferenças nesses fatores podem modificar o resultado obtido nessas comparações (fato comprovado pelos resultados dos artigos anteriormente citados nesta revisão); a formulação dos comprimidos utilizados pode ter alterado os valores de $T_{máx}$ e $T_{1/2\beta}$; e o $C_{máx}$ de administração oral foi maior que por SC.

Outrossim, outros fatores que podem influenciar a análise farmacocinética e farmacodinâmica são: porcentagem de gordura corporal (ZORAN, D., RIEDESEL, D., DYER, D., 1993); diferenças no tempo de trânsito gastrointestinal, fermentação intestinal e biodisponibilidade (FLEISCHER, S. et al., 2008); longo tempo de transição acarreta em uma prolongação do tempo de esvaziamento gástrico e no tempo de trânsito no intestino delgado (WEBER, M.P. et al., 2002); horário de alimentação pode gerar diferentes $T_{máx}$ (PAULSON, S.K. et al., 2001); tamanho do intestino delgado em diferentes raças (ALBORS, O.L. et al., 2011); idade, raça e dieta também podem afetar esvaziamento gástrico e intestinal e tempo de trânsito no intestino grosso e a flora intestinal (MARTINEZ, PAPICH, 2009; OSWALD et al., 2015; RASTALL, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

A validação de uma técnica analítica é essencial para garantir a confiança nos resultados obtidos. No entanto, ao realizar buscas sobre a farmacocinética e validação da ivermectina em cães, percebeu-se que as informações são escassas e limitadas em todos os países. Esse quadro de poucos estudos em cães se agrava quando se analisa quantos medicamentos comerciais contendo ivermectina disponíveis no território brasileiro foram estudados, somente um estudo identificado. Portanto, decidiu-se desenvolver e validar um novo método que tivesse reduzida utilização de solventes orgânicos em seu método de extração, menor tempo de corrida, menor volume de amostra utilizado e capacidade de ser aplicado em estudos farmacocinéticos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Otimização e validação de método bioanalítico para quantificação de ivermectina em amostras de plasma canino, para estudos de farmacocinética.

4.2. Objetivos específicos

- Revisão bibliográfica;
- Otimizar condições de extração e de LC-MS/MS em amostras de plasma canino;
- Validar método bioanalítico proposto;
- Método bioanalítico possuir vantagens analíticas comparando-se com estudos já existentes;
- Aplicar método validado em amostra de plasma canino em um (01) animal, como prova de conceito.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Revisão bibliográfica

As buscas de informações base para esse estudo foram realizadas durante o período 20/12/2018 - 20/01/2019 nos sítios de busca: “<https://www.base-search.net/about/en>”, “<https://www.scholar.google.com.br>”, “<https://www.refseek.com>”, <http://www.scielo.org/php/index.php>, “<https://link.springer.com>” e “<https://www.ncbi.nih.gov/pubmed/>”.

As palavras-chave utilizadas foram: “ivermectina”, “ivermectina cães”, “ivermectina cães ectoparasitas”, “ivermectina cães endoparasitas”, “ivermectina oral cães ectoparasitas”, “ivermectina oral cães endoparasitas”, “ivermectina farmacocinética cães”, “ivermectina eficácia cães”, “métodos bioanalíticos da ivermectina”, “ivermectin”, “ivermectin dogs”, “oral ivermectin dogs ectoparasites”, “oral ivermectin dogs endoparasites”, “ivermectin pharmacokinetics dog”, “ivermectin efficacy dogs”, “Analytical methods ivermectin”.

5.2. Experimentação animal

O estudo em questão foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG) e aprovado sob o projeto de número 068/20.

Todos os protocolos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com as normas institucionais da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFG. O animal foi manuseado por profissionais habilitados e, antes do início dos experimentos, foi aclimatado para familiarização com o experimentador e com o ambiente.

Para a realização da prova de conceito, utilizou-se uma (01) cadela (AL-AZZAM, S.I. et al., 2007; DAURIO, C.P. et al., 1992; ERASLAN, G. et al., 2010; GOKBULUT, C. et al., 2006; MAGALHAES, V.S. et al., 2016) sem raça definida (SRD) adotada do Centro de Zoonoses de Goiânia tendo 2 anos de idade, 14 kg, saudável, acondicionada pela Escola de Veterinária da

UFG (Hospital Veterinário), com o apoio da médica veterinária Luana Rodrigues Borboleta (CRMV 3803 – GO).

À cadela foi fornecida água potável com livre acesso e troca diária, além de ração premium comercial para cães, duas vezes ao dia, em quantidade suficiente para as características físicas do animal e foi abrigada no galpão de experimentação de animais da EVZ/UFG. Esse galpão é equipado com 18 baias individuais (2,12 m²), teladas, com telhado e abrigo, temperatura e umidade ambiente, boa ventilação e luminosidade natural, no entanto como não havia outros animais no local foi permitido deixá-la em um espaço onde havia 6 baias e mais um espaço intermediário entre elas, totalizando – aproximadamente - 25 m². Outrossim, a cama do animal na baia foi forrada com caixas de papelão, toalhas e tapetes. A fim de ambientar o animal, foi fornecido brinquedos e passeios diários, ademais de uma área com gramado para que a cadela tivesse banho de sol e pudesse socializar com possíveis outros indivíduos de sua espécie que estivessem na EVZ/UFG, especialmente próximos ao Hospital Veterinário (HV/UFG).

Para a coleta de sangue, foram utilizados tubos de hemograma com EDTA com volume de 3 mL. A coleta foi feita pela médica veterinária Luana Borboleta (CRMV – 3803 – GO). As amostras foram armazenadas em freezer (temperatura -2 a -8°C) e, posteriormente, centrifugadas para obtenção do plasma.

Após o estudo ser finalizado, o animal foi encaminhado para procedimento de adoção – considerando a responsabilidade e comprometimento dos adotantes com a vida do animal.

5.3. Materiais

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (LC-MS/MS) 4500 QTRAP Sciex™ utilizando-se coluna de fase reversa C18, 50 mm x 4,6 mm x 5 µm (Agilent Zorbax®, Santa Clara – California, EUA) e computador de bancada com elevada capacidade de armazenamento e alta velocidade

de processamento de dados localizado no LABFAR, enquanto as amostras foram preparadas no NEPET.

Para que as análises dos cromatogramas fossem devidamente realizadas, preliminarmente, foi adquirido o produto Ivomec[®] (Boehringer Ingelheim[®], São Paulo – São Paulo, Brasil), solução injetável a 1% de ivermectina comumente utilizada em bovinos, ovinos, suínos. O produto Ivomec[®] foi adquirido por ter maior disponibilidade em estabelecimentos veterinários brasileiros e por possuir um melhor custo-benefício.

O padrão de ivermectina (Sigma Aldrich[®], Saint Louis – Missouri, EUA) adquirido, possui – não menos que – 90% de pureza da ivermectina B_{1A} e – não mais que – 5% da ivermectina B_{1B} (Figura 1), sendo necessário armazenar na faixa de temperatura de 2 a 8 °C.

Utilizou-se uma balança quantitativa de precisão (Mettler Toledo[®], Columbus - Ohio, EUA), agitador do tipo vórtex (D-Lab Gomixer MX-S[®], Curitiba – Paraná, Brasil), sistema ultrapurificador de água (Gehaka[®], São Paulo – São Paulo, Brasil), centrífuga de alta rotação CF16RN (Hitachi[®], Chiyoda – Tóquio, Japão) e lavadora ultrassônica (UNIQUE[®], Indaiatuba – São Paulo, Brasil).

Os solventes utilizados foram: metanol, formiato de amônio (Vetec[®], Duque de Caxias – RJ, Brasil), ácido fórmico (Synth[®], Diadema – SP, Brasil), acetonitrila (J.T. Baker[®], Phillipsburg – New Jersey, EUA), éter metil terc-butílico, todos em grau HPLC.

5.4. Métodos

A extração do analito da matriz biológica (Figura 3) foi baseada em dados disponíveis na literatura acerca da análise cromatográfica ou da detecção por espectrômetro de massas do fármaco, tal como as condições utilizadas por Morbidelli e colaboradores (2018). Após essa análise, decidiu-se prosseguir com 250 µL de amostra ou plasma que foram contidos em eppendorf[®], com capacidade de 2 mL, previamente descongelados em temperatura ambiente e homogeneizados em vórtex por 10 segundos, 50 µL de padrão interno abamectina (250 ng/mL) adicionados e agitados em vórtex por 10 segundos, 200 µL de acetonitrila também adicionados e

homogeneizados em vórtex por 30 segundos com posterior procedimento centrifugação a 6.000 g por 5 minutos.

Transfere-se o sobrenadante resultante da centrifugação para outro eppendorf®, adiciona-se 1000 µL de MTBE, homogeneização em vórtex por 30 segundos, centrifugação a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. Retirada de 1100 µL de sobrenadante, secagem a 50°C com fluxo de ar nitrogênio, ressuspensão com 200 µL da fase móvel (MeOH:H₂O (90:10), ambas com adição de 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico), vórtex por 30 segundos, centrifugação a 14.000 g por 10 minutos e, por último, transferência de 175 µL para insert de fundo cônico contido em vial de vidro âmbar de volume 2 mL com tampa rosca de 9 mm e septo.

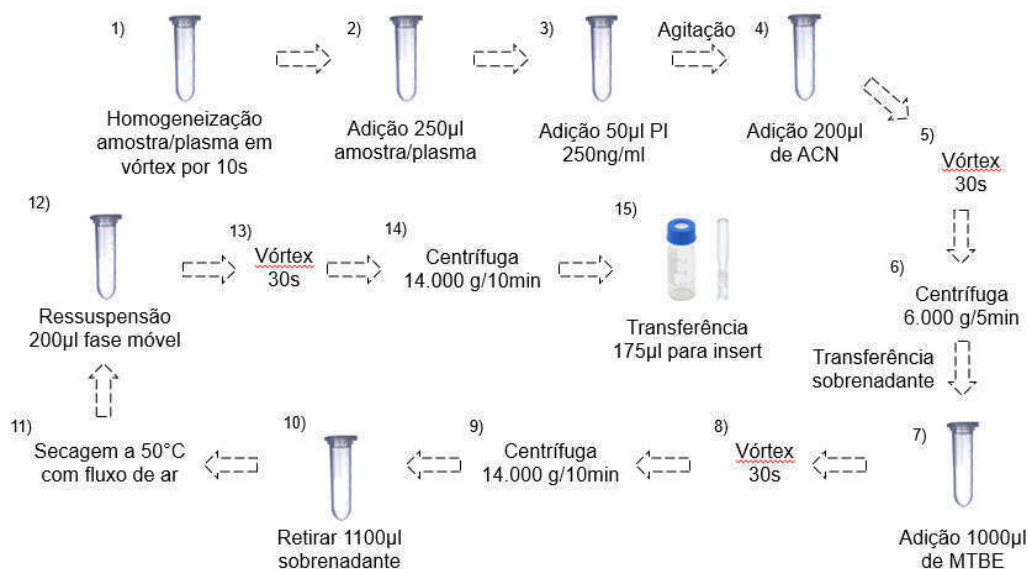


Figura 3. Esquema do método de extração por precipitação de proteínas seguido por extração líquido-líquido (PPT-LL).

Os vials são inseridos no amostrador do cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas 4500 QTRAP Sciex™. A fase móvel utilizada foi de MeOH:H₂O (90:10), ambas com adição de 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico, com volume de injeção de 30 µl, fluxo de 0,8 mL/min e tempo de corrida de 6 minutos, sendo Zorbax C18 50 x 4,6 mm x 5µm a coluna de escolha.

Os parâmetros otimizados para *Flow Injection Analysis* do espectrômetro de massas para a ivermectina no modo positivo e da análise

de MRM da IVM e ABM estão representadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, ambas com concentração de 1 µg/mL. Optou-se pelo modo positivo, pois a intensidade tende a ser mais elevada e os resultados mais estáveis. Este comportamento se deve à ligação iônica que ocorre entre a IVM, ou a ABM, carregadas negativamente ao íon amônio carregado positivamente, sendo essa ligação favorecida pela adição de ácido fórmico.

Tabela 1. Parâmetros otimizados por FIA para IVM e ABM no modo positivo.

Molécula	Curtain gas	Collision gas	Ion spray voltage (V)	Temperature	Ion source Gas 1	Ion source Gas 2
IVM	20,0	Médio	5500,0	550,0	50,0	50,0
ABM						

Tabela 2. Parâmetros otimizados da análise de MRM para IVM e ABM no modo positivo.

Molécula	Massa íon pai	Massa íon filho	Dwell time (ns)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
IVM	892,5	569,3	350	60,0	5,0	25,0	10,0
	892,5	307,4	350	60,0	5,0	35,0	10,0
ABM	890,5	567,4	350	60,0	5,0	25,0	10,0
	890,5	305,3	350	60,0	5,0	35,0	10,0

Legenda: ABM, abamectina; CE, energia de colisão; CXP, potencial de saída; DP, Potencial de dessolvatação; EP, potencial de entrada; IVM, ivermectina.

Para validação da metodologia, utilizou-se plasma canino doado pela clínica veterinária Dermopet®, localizada em Goiânia/GO. Injetou-se duas (02) amostras branco, duas (02) amostras zero, uma curva analítica com sete (07) concentrações (2,5, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0, 100,0 e 250,0 ng/mL), com cada concentração sendo preparada em duplicata. Após a curva analítica foram injetadas duas amostras branco para verificação de efeito residual (verificar se picos analíticos continuam a aparecer em injeções posteriores) e quintuplicatas dos controles de qualidade: limite de quantificação (LIQ, 2,5 ng/mL); controle de qualidade baixo (CQB, amostra com até três vezes o valor da concentração de LIQ, 7,5 ng/mL); controle de qualidade médio (CQM, amostra que se encontra aproximadamente no valor médio entre o LIQ e o limite superior de quantificação, 125 ng/mL); e

controle de qualidade alto (CQA, aquela que possui de 75% a 85% da concentração do limite superior de quantificação, 200 ng/mL).

Segundo a RDC nº 27/2012, o LIQ deve ter uma exatidão de 80 a 120% da concentração nominal e a precisão – mensurada através do DPR – não pode ser maior que 20%; ao mesmo tempo que para as outras concentrações e controles de qualidade (CQB, CQM e CQA) os valores de exatidão, calculada pelo erro padrão relativo, EPR (Equação 1), são de 85 a 115% e de precisão, calculada pelo desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, DPR ou CV (Equação 3) de 15%. Essa última sendo a calculada através da relação do desvio padrão, DP, (Equação 2) e média.

$$EPR = \left(\frac{\text{Concentração média experimental} - \text{valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$DP = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

$$DPR = CV = \frac{DP_{FMN}}{\text{Média}_{FMN}} \quad (3)$$

Estudos de estabilidade de curta duração (4 horas em temperatura ambiente), ciclos de congelamento e descongelamento (3 ciclos no total), de pós-processamento (5 horas a 15 °C no amostrador do HPLC) e de longa duração (-20 °C) são exigidos pela RDC nº 27/2012 devendo ter um valor de 85 a 115% do valor nominal, logo também foram realizados.

Outro estudo realizado foi o de efeito matriz em que se injeta o analito em solução e, posteriormente, uma amostra de plasma para que seja verificado se há a ocorrência de *carryover*. Para avaliação desse estudo foram injetadas 02 CQBs e 02 CQAs hemolisados e 04 CQBs e 04 CQAs, sendo avaliados através dos parâmetros fator de matriz normalizado (FMN) (Equação 4), desvio padrão, desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, razão das áreas (Equação 5) e média da razão das áreas (Equação 6).

$$FMN = \frac{\text{Área}_{\text{pico analito}} / \text{Área}_{\text{pico PI}}}{\text{Média razão das áreas}_{\text{solução}}} \quad (4)$$

$$\text{Razão das áreas} = \frac{\text{Área}_{\text{pico analito}}}{\text{Área}_{\text{pico PI}}} \quad (5)$$

$$\text{Média razão das áreas} = \frac{\text{Razão das áreas}_{\text{solução 1}}}{\text{Razão das áreas}_{\text{solução 2}}} \quad (6)$$

Segundo a RDC nº 27/2012, para FMN, os resultados devem estar próximos a 1 e para CV devem ser menores ou iguais a 15%.

Para a etapa farmacocinética, uma cadela foi adotada do Centro de Zoonoses de Goiânia. Informações mais detalhadas acerca do animal estão inseridas no tópico 5.2.

Foram obtidas 12 amostras da cadela nos seguintes intervalos: 1, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 36 horas, 3, 6, 12 e 18 dias (MAGALHAES, V.S. et al., 2016). O volume de sangue a ser coletado foi o suficiente para se obter 250 µL de plasma, o qual foi definido por causa das características impostas pelo método bioanalítico a ser empregado (LC-MS/MS), características de estabilidade do fármaco, bem como dos aspectos regulamentares (BRASIL, 2012) relacionadas à avaliação proposta.

Para fins de avaliação do perfil farmacocinético, além da quantificação da concentração plasmática do fármaco, foi essencial o registro, durante os períodos de tratamento, do intervalo entre a coleta seriada das amostras de sangue e a administração da medicação. Para tanto foram registrados, para a cadela, os horários reais de administração do medicamento e o horário de coleta de cada amostra de sangue, identificando-se também o período do estudo a que se refere.

5.5. Avaliação e determinação de perfil farmacocinético da ivermectina por LC-MS/MS.

O perfil farmacocinético da ivermectina foi determinado a partir da administração de um comprimido de 1000 mg, destinado a cães com 10 kg

de peso corporal, por via oral, disponível no mercado (Top Dog[®], Ouro Fino[®], dose de 0,06 mg/comprimido de ivermectina).

O equipamento de LC-MS/MS 4500 QTRAP da SciexTM possui a fonte de ionização por eletrospray e detector triplo quadrupolo, sendo o terceiro quadrupolo um detector quadrupolo híbrido com ion trap. A coluna utilizada foi de fase reversa: C18 50 mm x 4,6 mm x 5 µm - Zorbax[®], solventes grau HPLC – J.T. Baker[®] (Acetonitrila) e Synth[®] (ácido fórmico) - e água ultrapura - Gehaka[®].

As coletas foram realizadas com auxílio da profissional médica veterinária Luana Rodrigues Borboleta (CRMV 3803 – GO) nas dependências do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV – EVZ/UFG). Nesses procedimentos de coleta foram utilizadas seringas de 3 mL, agulhas de 25 x 7 mm, tubos de hemograma com EDTA de 3 mL, TPO (acessório com a finalidade de reduzir o número de aplicações) e cateteres 20G.

Após a coleta de sangue utilizou-se centrífuga Quimis[®] Aparelhos Científicos Ltda. (Diadema - São Paulo, Brasil), para obtenção do plasma sanguíneo, localizado no Laboratório de Toxicologia da EVZ/UFG, sob supervisão da Profa. Dra. Ana Flávia Machado Botelho, armazenados em freezer a -20°C até o momento da análise. De acordo com procedimentos previamente descritos, foram mensuradas as concentrações sanguíneas por meio da técnica bioanalítica validada.

Depois da quantificação das amostras, os dados obtidos foram inseridos em uma planilha eletrônica e plotados na forma de gráfico, concentração vs tempo no software Microsoft Excel e suplemento PKSolver (ZHANG, Y. et al., 2010), para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos: área sob a curva de concentração vs tempo (ASC), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$), constante de velocidade de eliminação (Kel), *clearance* total (Cl_T), volume de distribuição (Vd), concentração plasmática máxima ($C_{máx}$) e tempo para obtê-la ($T_{máx}$), sendo que $C_{máx}$ e $T_{máx}$ foram obtidos diretamente do gráfico C vs t. A $t_{1/2}$ foi obtida através do decaimento exponencial da concentração do fármaco, juntamente com a Kel

($K_{el} = 0,693/t_{1/2}$); ASC (ASC_{0-t} e ASC_T) foram obtidas utilizando-se, para cálculos, o método dos trapézoides. O valor obtido para o parâmetro ASC_T foi empregado nos cálculos do Cl_T ($Cl_T/F = Dose/ ASC_T$) e do V_d ($V_d = Cl/K_{el}$).

6. Resultados e Discussão

De acordo com $\log P$, testou-se os seguintes candidatos a padrão interno (Tabela 3): diazepam, amiodarona, etinilestradiol, indometacina, efavirenz e doramectina. No entanto, decidiu-se seguir com o fármaco abamectina (ABM) devido à maior similaridade estrutural (Figura 3), além de pertencer à mesma classe terapêutica, possuir melhor reprodutibilidade, exatidão e precisão nas injeções, comparando com os outros candidatos.

Tabela 3. Candidatos a padrão interno para validação analítica de ivermectina.

Padrão interno	LogP
Diazepam	3,0
Amiodarona	7,6
Etinilestradiol	3,7
Indometacina	4,3
Efavirenz	4,0
Doramectina	4,5
Abamectina	11,3
Ivermectina	4,1

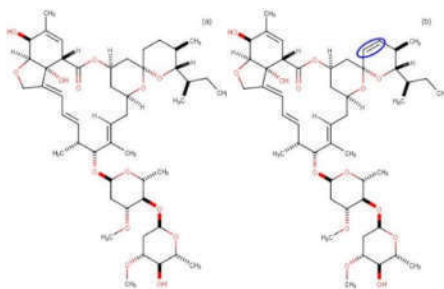


Figura 4. Comparação estrutura molecular entre ivermectina (a) e abamectina (b), diferenças explicitadas por círculos azuis.

Para escolha das colunas, testou-se as seguintes (Tabela 4):

Tabela 4. Candidatas a colunas para validação analítica de ivermectina.

Coluna	Dimensões		Diâmetro partículas (μm)
	Comprimento (mm)	Largura (mm)	
Ace [®] C8	50	4,6	5
Ace [®] C8	150	4,6	5
Ace [®] C18	250	4,6	5
Ace [®] C18	150	4,6	5
Phenomenex [®] Kinetex C8	150	4,6	5
Phenomenex [®] C18	100	4,6	5
Zorbax [®] C18	50	4,6	5

A escolha das colunas se baseou no potencial de retenção, seja devido ao tamanho da coluna em si ou o tamanho da cadeia carbônica ligada à sílica. A candidata selecionada foi a coluna Zorbax[®] C18 50 x 4,6 mm 5 μm devido à superior recuperação, exatidão e precisão nos testes realizados com ela.

Já para a fase móvel foram testadas as seguintes composições (Tabela 5):

Tabela 5. Candidatas a fase móvel para validação analítica de ivermectina.

Fase aquosa	Fase orgânica	Eluição
15% Água	85% Acetonitrila	Gradiente
30% Água	60% Metanol 10% Acetonitrila	Gradiente
15% Ácido fórmico	85% Acetonitrila	Gradiente
15% Hidróxido de amônio (pH 10)	85% Acetonitrila	Gradiente
15% Água	85% Acetonitrila	Gradiente
10% Água	90% Metanol	Gradiente
37% Água	63% Acetonitrila	Isocrática
22% Água	78% Acetonitrila, 0,1% de trietilamina	Isocrática
30% Água, 5mM de formiato de amônio e 5mM de acetato de amônio	70% Acetonitrila, 5mM de formiato de amônio e 5mM de acetato de amônio	Isocrática
20% Água, 5mM formiato de amônio	90% Acetonitrila, 5mM formiato de amônio	Isocrática
10% Água, 5mM formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico	90% Metanol, 5mM formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico	Isocrática

Escolheu-se a fase móvel de água:metanol (10:90) ambas com adição de 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico devido ao superior perfil cromatográfico, melhor ionização do analito e PI e melhor formato do pico.

Segundo a RDC nº 27 de 17 de maio de 2012, a curva de calibração deve ter uma amostra branco, uma amostra zero (branco com adição de PI) e no mínimo seis amostras de diferentes concentrações. Para o limite inferior de quantificação, LIQ, o desvio em relação à concentração nominal deve ser menor ou igual a 20%; ao mesmo tempo que, para as outras concentrações, o desvio deve ser menor ou igual a 15%. No entanto, os testes realizados não atenderam a esses critérios. Todos acima dos limites da referida RDC e realizando repetições do mesmo vial, o que revela um revés do método cromatográfico ou de extração proposto.

Para sanar a dúvida da baixa performance dos resultados, modificou-se o método de extração. Testes de extração foram feitos com os seguintes solventes orgânicos (Tabela 5): MTBE (logP = 0,9), extração simples; MTBE, extração exaustiva; Hexano (logP = 3,9), extração simples; Ciclohexano (logP = 3,4), extração simples; Mistura de clorofórmio (logP = 2,3) e éter etílico (logP = 0,9) na proporção de 3:1, extração simples; Precipitação de proteínas com ACN.

Entende-se por extração simples, a extração que só há uma adição do solvente orgânico em vez de duas. Considerou-se para os cálculos da Tabela 6, a média das áreas obtidas das soluções do analito e do padrão interno comparando com as áreas obtidas com os candidatos a extratores.

Tabela 6. Testes de extração simples e exaustivas, de ivermectina, em amostras de 200 ng/mL com distintos solventes orgânicos.

Nome do solvente	Recuperação analito (%)	Recuperação PI (%)
MTBE	43,79	64,03
MTBE exaustivo	75,08	67,12
Hexano	35,90	104,66
CLET	32,79	44,09
Ciclohexano	28,58	97,53
PPT ACN	25,21	37,75

Legenda: ACN, acetonitrila; CLET, clorofórmio:éter etílico (75:25); MTBE, éter metil terc-butílico; PI, padrão interno; PPT, precipitação de proteínas.

Corroborou-se, observando os valores da Tabela 6, que o método de extração exaustiva com MTBE foi o mais adequado, seguido pelo método de extração simples com MTBE e o método de extração exaustivo com hexano. No entanto, o método de extração exaustiva com MTBE parece extrair uma maior quantidade de componentes plasmáticos que se encontram no tempo de retenção da IVM. Logo, o método com MTBE extração simples foi escolhido para prosseguir os ensaios. Outrossim, testou-se executar uma etapa de precipitação de proteínas (PPT) antes de iniciar a extração líquido-líquido (LL) devido à quantidade de proteínas plasmáticas existentes no plasma canino (UNIPROT, 2020).

Após definição de fase móvel, coluna, método de extração (Figura 3), método cromatográfico (fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 30 µL, tempo de corrida de 6min, tempo de retenção do analito de aproximadamente 2,85 min, tempo de retenção do PI de aproximadamente 1,64 min) e de otimizar os parâmetros para a ABM (Tabelas 1 e 2), foram feitos ensaios analíticos para verificar se o método estava adequado para ser utilizado em um estudo farmacocinético. Para realizá-la foram feitas 04 amostras branco, duas no início e duas para verificação de efeito residual; 02 amostras zero, 02 amostras de cada ponto da curva de calibração, 05 amostras CQB (3 ng/mL), 05 amostras CQM (80 ng/mL), 05 amostras CQA (160 ng/mL).

Para os testes com plasma, recebeu-se uma doação de duas bolsas de plasma canino da clínica veterinária Dermopet, localizada em Goiânia-GO. Com o plasma em mãos, realizou-se o ensaio de efeito matriz (Tabela 7).

Outrossim, além da injeção das soluções de CQB e CQA também foram feitas 04 amostras de CQB e CQA em plasma normal e 02 amostras de CQB e CQA em plasma hemolisado.

Tabela 7. Amostras de CQB e CQA para avaliação do ensaio de efeito matriz.

Nome amostra	Razão das áreas	FMN
CQB H1	0,29	1,14
CQB H2	0,25	1,00
CQB 1	0,27	1,06
CQB 2	0,26	1,03
CQB 3	0,23	0,93
CQB 4	0,27	1,07
CQA H1	6,75	1,21
CQA H2	6,29	1,13
CQA 1	6,08	1,09
CQA 2	6,47	1,16
CQA 3	5,79	1,04
CQA 4	6,38	1,15
Média	-	1,08
DP	-	0,08
CV (%)	-	7,4

Legenda: CQA, controle de qualidade alta; CQB, controle de qualidade baixo; CV, coeficiente de variação; DP, desvio padrão; H, hemolisado; FMN, fator de matriz normalizado.

Ademais, as áreas do pico do analito e do PI – tanto das amostras de CQB, quanto de CQA – tiveram baixa variação de uma amostra para a outra, mesmo se a comparação for feita entre amostras com plasma hemolisado e plasma normal. Fato este que é comprovado pela razão das áreas.

Fora do ensaio de efeito matriz, também se testou o método em amostras LIQ, a fim de se verificar se o método estava resultando em áreas do pico quantificáveis. Ou seja, verificou-se neste teste se ainda estava ocorrendo o efeito de supressão iônica nas amostras com menores concentrações.

Todas as injeções de LIQ tiveram áreas do pico do analito e do PI próximas e, conseqüentemente, uma razão das áreas também similar. Dito isso, é importante ressaltar que a exatidão de todas as amostras está dentro da faixa preconizada pela RDC nº27/2012 e, desta maneira, confirma que o método de extração PPT-LL é mais adequado que o método de extração exaustivo.

Posteriormente, portanto, realizou-se 03 avaliações em dias distintos, as quais os resultados estão representados na Tabela 8.

Tabela 8: Precisão e exatidão para ivermectina em plasma canino (n=5).

Concentração nominal (ng/mL)	Precisão intra-dia (CV, %)	Exatidão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (CV, %)	Exatidão inter-dia (%)
	8.6	111.8	11.6	109.0
2.5	11.3	106.3	-	-
	14.9	109.0	-	-
	4.1	101.7	6.7	99.3
7.5	5.4	95.7	-	-
	10.5	100.6	-	-
	9.9	114.61	6.4	108.4
125	3.4	105.2	-	-
	6.0	105.3	-	-
	5.9	95.0	6.6	98.1
200	9.7	102.1	-	-
	4.0	97.3	-	-

Legenda: CV, coeficiente de variância.

Para os resultados de precisão e exatidão intra e inter-dia, foram injetadas triplicatas das concentrações LIQ, CQB, CQM e CQA. A precisão intra-dia teve CV na faixa 4,0 – 14,9% e a inter-dia 6,4% - 11,6%; a exatidão intra-dia teve valores na faixa 95,0 – 114,61% e a inter-dia 98,1 – 109,0%.

Outrossim, a legislação de validação de métodos bioanalíticos também exige que sejam realizados testes de estabilidade de pós-processamento,

curta duração, ciclos de congelamento e descongelamento. Logo, esses testes também foram realizados (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados dos estudos de estabilidade (n=3).

Concentração nominal (ng/mL)	Curta duração (TA, 4h, %)	Congelamento-descongelamento (3 ciclos, %)	Pós-processamento (autosampler, 15 °C, 5 h, %)
7.5	99.4	88.8	95.0
200	97.1	98.0	98.2

Legenda: TA, temperatura ambiente.

Faz-se necessário, também, ressaltar métodos de alguns estudos anteriormente desenvolvidos para que seja possível comparar a efetividade do método desenvolvido no presente estudo. Como, por exemplo, de Kojima e colaboradores (1987) que utilizaram uma quantidade oito vezes maior de amostra, maior volume de solventes orgânicos no processo de extração (0,6 mL de ácido tricloroacético, 15,0 mL tampão fosfato, 12,1 mL de metanol, reagente derivatizante, 7,0 mL de clorofórmio), maior tempo de extração (maior que 1,0 h), maior tempo de corrida (12 min).

Já comparando com o estudo de Gokbulut e colaboradores (2006), este estudo utilizou um volume quatro vezes maior de amostra, maior quantidade de solventes orgânicos na extração (1,0 mL de acetonitrila, 5,0 mL de clorofórmio, 0,1 mL de reagente derivatizante, 0,15 mL de anidrido trifluoroacético), maior tempo de extração (maior que 0,5 h).

Al-Azzam e colaboradores (2007) também utilizaram um maior volume de resíduos orgânicos no seu processo de extração (0,1 mL de acetonitrila, 3,0 mL de metanol, 2,0 mL de isopropanol, 0,1 mL de reagente derivatizante, 0,15 mL de anidrido trifluoroacético) e tempo de corrida consideravelmente maior (30 min).

Lehner e colaboradores (2009) realizaram um estudo utilizando LC-MS/MS com fonte ESI no modo positivo, no entanto somente conseguiram encontrar o aduto de sódio ($M+Na^+$) e de potássio ($M+K^+$) da ivermectina. Os autores não sabem a quantidade desses íons nas amostras. Diferentemente do atual estudo que não teve essa variável dos adutos e a quantidade de todos os íons que estavam na amostra/padrão foram controlados.

Dunn e colaboradores (2011), de maneira semelhante, optaram por um método de extração que usava maior volume de solventes orgânicos (solução 3:1 de água:acetonitrila, 4,0 mL de metanol, 1,0 mL de solução 3:1 de água:metanol, 0,06 mL de reagente derivatizante e 0,1 mL de anidrido trifluoroacético) e maior tempo de corrida (10 min).

Magalhães e colaboradores (2016) utilizaram um volume de amostra duas vezes maior que o atual estudo, maior tempo de extração (maior que 1 hora) e de tempo de corrida (10 min).

Por último, Morbidelli e colaboradores (2018) utilizaram um volume de amostra duas vezes maior, maior volume de solventes orgânicos (4,0 mL de acetonitrila, 2,0 mL de n-hexano, 0,2 mL de solução 1:1 de metanol:água com adição 5mM de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico), maior tempo de extração (maior que 40 min) e maior tempo de corrida (15 min).

6.1. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos.

Os resultados foram referidos como médias \pm erro padrão destas. A análise farmacocinética foi realizada com os seguintes *softwares*: Microsoft Excel 2010 e software PKSolver - suplemento para Excel (Microsoft).

Segundo o software PKSolver os dados farmacocinéticos adquiridos por meio do gráfico concentração vs tempo, utilizando o método dos trapezoides gerou o seguinte gráfico (Figuras 5) e os dados foram plotados na Tabela 10.

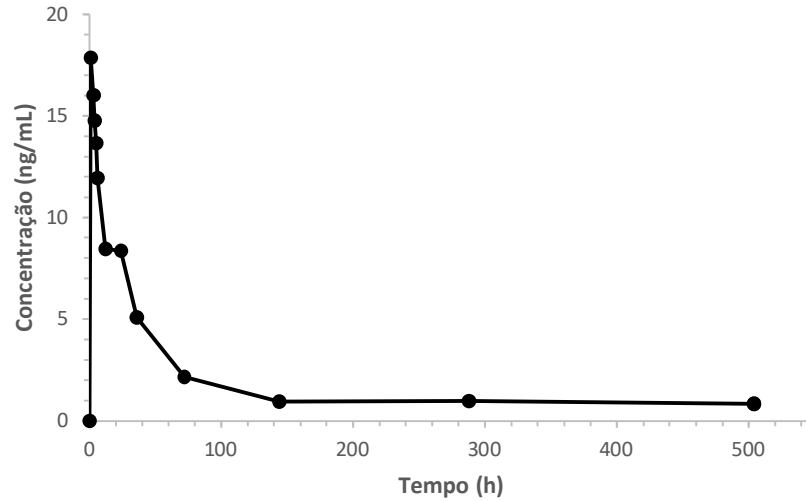


Figura 5. Perfil farmacocinético da ivermectina em cadela SRD após administração oral de 0,06 mg de ivermectina. Cada ponto representa a média \pm DP de 2 injeções em LC-MS/MS.

Tabela 10: Parâmetros farmacocinéticos das amostras obtidos por meio do software PKSolver.

Dose (mg)	T _{máx} (h)	C _{máx} (ng/mL)	AUC _{0-inf_obs} (ng/mL*h)	t _{1/2} (h)	MRT _{0-inf_obs} (h)	K _{el} (1/h)	Cl _T (mL/min/kg)	V _d (L/Kg)
0.06	1.00	17.85	2113,21	1006,86	1182,44	6,88 x 10 ⁻⁴	4,73	41,24

Legenda: AUC_{0-inf_obs}, área sob a curva do tempo 0 até infinito; Cl_T, clearance do tempo 0 até o infinito; C_{máx}, concentração máxima obtida no gráfico concentração vs tempo; K_{el}, constante de eliminação; MRT_{0-inf_obs}, tempo médio de residência do tempo 0 ao infinito; t_{1/2}, meia-vida; T_{máx}, tempo em que se atingiu C_{máx}; V_d, volume de distribuição.

Ao considerar os resultados da Tabela 10, pode-se perceber que a ivermectina é um fármaco de múltiplos compartimentos devido ao seu alto volume de distribuição e meia-vida que mostram a tendência da ivermectina de se distribuir para outros tecidos ou órgãos. Tanto altamente irrigados (rins, fígado, pulmões), quanto com irrigação menos intensa (pele, tecido adiposo e ossos), além de poderem ser armazenado nos menos irrigados (BRUNTON et al., 2012).

7. CONCLUSÃO

Através de comparação com estudos previamente realizados, pôde-se perceber que o método otimizado e validado neste estudo, caso comparado com outros autores, teve as seguintes vantagens analíticas: reduzida utilização de solventes orgânicos, menor tempo de corrida, menor volume de amostra utilizado e capacidade de ser aplicado em estudos farmacocinéticos. Logo, dentro do limitado escopo de estudos para avaliação de plasma canino é um método importante considerando-se o tempo de existência da ivermectina e a sua baixa quantidade de artigos com cães como animal alvo.

8. ANEXOS

8.1. Certificado de aprovação do protocolo nº. 068/20 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Determinação do perfil farmacocinético da ivermectina em medicamentos veterinários comerciais, em cães**”, registrada com o protocolo nº 068/20, sob a responsabilidade de **Ney Ramos Toledo e Luiz Carlos da Cunha** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **07/12/2020**.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 07/12/2020 a 31/12/2021
- Espécie/linhagem/raça: *Canis lupus familiaris*
- Nº de animais autorizados: 9 animais
- Peso/Idade: 1-2 anos, 10-15kg
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): ONGs


Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

9. REFERÊNCIAS

AL-AZZAM, S.I. et al. Comparison of the pharmacokinetics of moxidectin and ivermectin after oral administration to beagle dogs. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 28, p. 431-438, 2007.

ALBORS, O.L. et al. Morphometry of the canine intestine with reference to the use of double balloon endoscopy. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 1, p. 113-118, 2011.

BELLINGER, A.M. et al. Oral, ultra-long-lasting drug delivery: application toward malaria elimination goals. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 365, p. 365ra157, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 maio 2012, n. 98, seção 1, p. 93.

CAMPBELL, W.C. et al. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. **Science**, v. 221, p. 823-828, 1983.

CAMPBELL, W.C. **Ivermectin and Abamectin**. New York: Editora Springer, 1989, cap. 18, p. 245-255.

CHACCOUR, C. et al. Pilot study of a slow-release ivermectin formulation for malaria control in a pig model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. e2104-16, 2017.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 62, 2008.

CLARK, S.L. et al. Long-term delivery of ivermectin by use of poly(D,L-lactico-glycolic)acid microparticles in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 6, p. 752-757, 2004.

CROUBELS, S. et al. Determination of ivermectin B_{1a} in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, p. 840-847, 2002.

CUNNINGHAM, CP. et al. Evaluation of a covered-rod silicone implant containing ivermectin for long-term prevention of heartworm infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 9, p. 1564-1569, 2006.

DAHIYA, M. et al. Quantitative determination of ivermectin in raw milk using positive ESI LC-MS/MS. **Journal of Chemistry**, v. 7, s. 1, p. S267-277, 2010.

DANAHER, M. et al. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 844, p. 1775-203, 2006.

DAURIO, C.P. et al. Bioavailability of ivermectin administered orally to dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 16, p. 125-130, 1992.

DENNY, K.H.; STEWART, C.W. Acute, subacute, subchronic, and chronic general toxicity testing for preclinical drug development. In: FAIQI, A.S. **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. Londres: Editora Elsevier, 2017, cap. 5, p. 109-127.

DUNN, S.T. et al. Pharmacokinetic interaction of the antiparasitic agents ivermectin and Spinosad in dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, p. 789-795, 2011.

DURDEN, D.A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **Journal of Chromatography B**, v. 850, p. 134-146, 2007.

DURDEN, L.A.; HINKLE, N.C. Fleas (Siphonaptera). In: MULLEN, G.R.; DURDEN, L.A. **Medical and Veterinary Entomology**. Londres: Editora Elsevier, 2019, cap. 10, p. 145-169.

DUTHALER, U.R.S. et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the analysis of ivermectin in plasma, whole blood, and dried blood spots using a fully automatic extraction system. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 172, p. 18-25, 2019.

EDWARDS, G. Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity?. **Filaria Journal**, v. 2, s1: s8.

ERASLAN, G. et al. Comparative pharmacokinetics of some injectable preparations containing ivermectin in dogs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2181-2185, 2010.

FAN, J.; de LANNOY, I.A.M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 93-120, 2014.

FLEISCHER, S. et al. Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 10, p. 110-119, 2008.

FOX, L.M. Ivermectin: uses and impact 20 years on. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.19, p. 588-593, 2006.

GAMBOA, G.V.U. et al. Ivermectin-loaded lipid nanocapsules: toward the development of a new antiparasitic delivery system for veterinary applications. **Parasitology Research**, v. 115, n. 5, p. 1945-1953, 2016.

GENCHI, M. et al. Pharmacokinetics and efficacy of an ivermectin implant for long-term prevention of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. **Parasitology Research**, v. 116, n. 6, p. 1723-1728, 2017.

GENG, Z. et al. Study of an injectable in situ forming gel for sustained-release of ivermectin in vitro and in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 271-276, 2016.

GOKBULUT, C. et al. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 347-354, 2006.

GONZÁLEZ-CANGA, A. et al. A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. **Current Drug Metabolism**, v. 10, p. 359-368.

BUXTON, I.L.O.; BENET, L.Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre: Editora AMGH, 2012, cap. 02, p. 17-40.

GWALTNEY-BRANT, S.M.; DECLEMENTI, C.; GUPTA, R.C. Macrocyclic lactone endectocides. In: GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology**. Kentucky: Editora Elsevier, 2018, cap. 43, p. 539.

HOLFORD, N.H.G. Pharmacokinetics & pharmacodynamics: rational dosing & the time course of drug action. In: KATZUNG, B.G. **Basic & Clinical Pharmacology**. United States of America: Editora McGraw-Hill Education, 2018, cap. 3, p. 42-45.

HAN, J. et al. Novel insertion mutation of ABCB1 gene in an ivermectin-sensitive Border Collie. **Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 4, p. 341-344, 2010.

HOWELLS, L., SAUER, M.J. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin b ion-trap LC-MSⁿ. **Analyst**, v. 126, p. 155-160, 2001.

HUGNET, C.; LESPINE, A.; ALVINERIE, M. Multiple oral dosing of ketoconazole increases dog exposure to ivermectin. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 311-318, 2007.

KOJIMA, K.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, Y. Determination of 22-23 dihydroivermectin B1a in dog plasma using solid-phase extraction and high-

performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 413, 326-331, 1987.

LEHNER, A.F. et al. ESI⁺ MS/MS confirmation of canine ivermectin toxicity. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, p. 111-119, 2009.

LO, P.A. et al. Pharmacokinetic studies of ivermectina: effects of formulation. **Veterinary Research Communications**, v. 9, p. 251-268, 1985.

MAGALHÃES, V.S. et al. Evaluation of pharmacokinetics and efficacy of ivermectin following oral administration in dogs against experimental infection of *Ctenocephalides felis felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 167-171, 2016.

MARTINEZ, M.N.; PAPICH, M.G. Factors influencing the gastric residence of dosage forms in dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 3, p. 844-860, 2009.

MARTINS, I. Validação analítica. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Ciências farmacêuticas: Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2016, cap. 3, p. 18-19.

MATHEWS, P.D. et al. Targeted drug delivery and treatment of endoparasites with biocompatible particles of pH-responsive structure. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 2, p. 499-510, 2018.

MCKELLAR, Q.A.; GOKBULUT, C. Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. **Current Pharmaceutical Biothechnology**, v. 13, p. 888-911, 2012.

MEALEY, K.L. Ivermectin: macrolide antiparasitic agents. In: PETERSON, M.E.; TALCOTT, P.A. **Small Animal Toxicology**. Missouri: Editora Elsevier, 2006, cap. 51, p. 785-794.

MEROLA, M.V.; EUBIG, P.A. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of p-glycoprotein in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 313-333, 2012.

MEROLA, V.M. EUBIG, P.A. Toxicology of avermectins and milbemycins (macrocyclic lactones) and the role of p-glycoprotein in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 48, n. 6, p. 991-1012, 2018.

MIYAJIMA, A. et al. Pharmacokinetics of ivermectin applied topically by whole-body bathing method in healthy volunteers. **Journal of Dermatology**, v. 44, p. 406-413, 2017.

MORBIDELLI, E. et al. A quick and simple method for the determination of ivermectin in dog plasma by LC–MS/MS. **Methods X**, v. 5, p. 1503-1507, 2018.

NEMZEK, J.A. et al. Biology and diseases of dogs. In: FOX, J. et al. **Laboratory Animal Medicine**. United States of America: Editora Elsevier, 2015, cap. 12, p. 511-512.

NOPPE, H. et al. Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC-APCI-MS-MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 9, p. 1232-1238, 2009.

NUNES, I.K.C. A importância do estudo do metabolismo nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 649-662, 2015

OGA, S.; FARSKY, S.H.P.; MARCOURAKIS, T. Toxicocinética. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2014, cap. 1.2, p. 7-19.

OSWALD, H. et al. Canine gastrointestinal physiology: breeds variations that can influence drug absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, n. A, p. 192-203, 2015.

OZDEMIR, Z. et al. Investigation of pharmacokinetic interaction between ivermectin and praziquantel after oral administration in healthy dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, p. 1-9, 2019.

PAPICH, M.G. Ivermectin. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs: Small and Large Animals**. North Carolina: Editora Elsevier, 2016, p. 420-423.

PAULSON, S.K. et al. Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 2, p. 638-645, 2001.

PEREIRA, T., CHANG, S.W. Semi-automated quantification of ivermectin in rat and human plasma using protein precipitation and filtration with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 1265-1276, 2004.

PHIPPS, A.N. et al. Disposition of ³H-selamectin and ³H-ivermectin in the brain of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* using micro-image analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 89-94, 2005.

PIVNICHNY, J.V. LAWRENCE, A.A.; STONG, J.D. A robotic sample preparation scheme for the high-performance liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma. **Journal of Chromatography Science**, v. 25, n. 5, p. 181-186, 1987.

^aRANG, H.P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016, cap. 08, p. 109-111.

^bRANG, H.P. et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016, cap. 10, p. 125.

RASTALL, R.A. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 8, p. 2022S-2026S, 2004.

da ROCHA, A.S. et al. Membrane-acaricide interface described by solubility. **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 5, p. 2212-2220, 2019.

SCOTT, E.W. MCKELLAR, Q.A. The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. **Veterinary Research Communications (Netherlands)**, v. 16, n. 2, p. 139-146, 1992.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

RUIZ, I. et al. Determination of natural pesticides in fresh fruits using liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 95, n.1, p. 238-243, 2012.

SILVA, E.P. Validação de método de extração e análise multirresíduo de medicamentos veterinários em amostras de leite e ovos por LC-MS/MS. **Repositório Institucional da UNB**, 2013.

STORPIRTIS, S.; de OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

TANG, S. et al. Pharmacokinetics of a new ivermectin/praziquantel suspension after intramuscular administration in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 54-58, 2016.

TAYLOR, M.A. Recent developments in ectoparasiticides. **The Veterinary Journal**, v. 161, p. 253-268, 2001.

TOP DOG: ivermectina. Méd. Vet. Sandra Barioni Toma. São Paulo: Ouro Fino Saúde Animal, 2019. Bula de medicamento veterinário.

TOUTAIN, P.L. et al. Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 3-8, 1997.

VAMATHEVAN, J.J. et al. Minipig and beagle animal model genomes aid species selection in pharmaceutical discovery and development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, p. 149-157, 2013.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

WALTHER, F.M. ALLAN, M.J.; ROEPKE, R.K.A. Plasma pharmacokinetic profile of fluralaner (Bravecto™) and ivermectin following concurrent administration to dogs. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 508, p.1123-1128, 2015.

WEBER, M.P. et al. Influence of age and body size on gastrointestinal transit time of radiopaque markers in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 5, p. 677-682, 2002.

ZAKSON-AIKEN, M. et al. Systemic activity of the avermectins against the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*), **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 576-580, 2001.

ZHANG, Y. et al. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 99, p. 306-314, 2010.

ZHU, M. et al. Identification of potential biomarkers of P-glycoprotein substrate neurotoxicity in transgenic mice expressing the mutated canine ABCB1 gene. **American Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 12, p. 1104-1110, 2014.

ZORAN, D.L. RIEDESEL, D.H.; DYER, D.C. Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 5, p. 755-760, 1993.