

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIODISPONIBILIDADE E TOLERABILIDADE DO  
DICLOFENACO DE SÓDIO VIA TÓPICA OU ORAL  
EM PÔNEIS SADIOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Marcos da Silva Azevedo**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**BIODISPONIBILIDADE E TOLERABILIDADE DO DICLOFENACO  
DE SÓDIO VIA TÓPICA OU ORAL EM PÔNEIS SADIOS**

**por**

**Marcos da Silva Azevedo**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Flávio Desessards De La Côte**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**BIODISPONIBILIDADE E TOLERABILIDADE DO DICLOFENACO  
DE SÓDIO VIA TÓPICA OU ORAL EM PÔNEIS SADIOS**

elaborada por  
**Marcos da Silva Azevedo**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**Comissão Examinadora:**

**Flávio Desessards De La Côte, PhD**  
(Presidente/Orientador)

**Adriano Bonfim Carregaro, Dr. (USP)**

**Mário Kurtz Filho, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador Prof. PhD Flávio Desessards De La Côte pela confiança e pela oportunidade de aprendizado na Clínica de Equinos da UFSM;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora e toda equipe do CEBIFAR pela execução da avaliação farmacocinética;

A minha co-orientadora Prof. Dra. Karin Erica Brass, pelos ensinamentos e confiança transmitidos nesses anos de convivência;

Ao Prof. Luiz Sérgio Segala de Oliveira pelo apoio e ensinamentos durante os anos de convivência;

Ao Méd. Veterinário Diogo Cardoso por acreditar e incentivar o nosso projeto;

Aos colegas e amigos Diego de Gasperi, Diego Rafael P. da Silva, Endrigo Pompermayer, Gabriele Biavaschi da Silva, Ricardo Pozzobon e Roberta C. da Fontoura Pereira pela colaboração na realização do experimento e pelo companheirismo durante o trabalho na clínica;

Aos estagiários da Clínica de Equinos pelo auxílio prestado durante o experimento;

Aos ex-colegas e sempre amigos Ana Helena Carrion, Douglas Griebeler, Fernanda Boligon Zembrzusi, Gustavo Freitas Ilha, Juliana Felipetto Cargnelutti, Juliana Sperotto Brum, Kalyne Bertolin, Liana Pereira de Pereira,

Aos meus Pais, Valmor e Neraci, que são os responsáveis por me proporcionar uma vida digna e sempre apoiaram minhas decisões.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **BIODISPONIBILIDADE E TOLERABILIDADE DO DICLOFENACO DE SÓDIO VIA TÓPICA OU ORAL EM PÔNEIS SADIOS**

Autor: Marcos da Silva Azevedo

Orientador: Flávio Desessards De La Côte

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2011.

Os estudos sobre a utilização tópica do diclofenaco conduzidos na espécie equina abordam em sua maioria a farmacocinética e o efeito clínico desta medicação. A tolerabilidade frente ao diclofenaco e a utilização deste medicamento por via oral têm sido pouco estudadas. Nossos objetivos foram obter dados relacionados à farmacocinética sanguínea e distribuição do diclofenaco de sódio no líquido sinovial, após a administração oral e tópica em pôneis saudáveis, bem como avaliar a tolerabilidade do diclofenaco de sódio administrado por via oral e tópica, usando uma frequência de administração semelhante a um período de tratamento. Pôneis clinicamente saudáveis foram divididos em três grupos e tratados com diclofenaco por via tópica (grupo I, n=6) e oral (grupo II, n=6), na dose de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> e fenilbutazona oral (grupo III, n=3) na dose de 2,2 mg kg<sup>-1</sup>. Para avaliar a biodisponibilidade foram coletadas amostras de sangue em diferentes momentos, desde 30 minutos até 144 horas após início do tratamento e amostras de líquido sinovial as 6, 12 e 24 horas, após o início do tratamento. Amostras de sangue foram coletadas a cada 24 horas até 144 horas após início do tratamento para hemograma, leucograma, bioquímico e coagulograma. Diferenças significativas foram encontradas entre o grupo I e o grupo II em determinados tempos no tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativado, fibrinogênio, hematócrito, hemoglobina, hemácias, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, eosinófilos e fosfatase alcalina. Resultados semelhantes foram observados entre o grupo II e o grupo III, no entanto o tempo de tromboplastina parcial ativado não apresentou diferença. Embora a concentração plasmática do diclofenaco de sódio no grupo II tenha sido mais elevada que no grupo I, a concentração sinovial foi maior no grupo I. Os dados obtidos sobre a biodisponibilidade e tolerabilidade do diclofenaco em pôneis mostram que a aplicação tópica é superior à oral por resultar em concentrações sinoviais mais elevadas do fármaco, além de ser mais segura, pois não alterou significativamente os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: farmacocinética, anti-inflamatório não esteroide, equinos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), concentração.

## **ABSTRACT**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **BIOAVAILABILITY AND TOLERABILITY OF TOPIC AND ORAL DICLOFENAC SODIUM IN HEALTHY PONIES**

Autor: Marcos da Silva Azevedo

Orientador: Flávio Desessards De La Côte

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2011.

Studies on the topical use of diclofenac in horses deal mostly with pharmacokinetics and the clinical effect of the medication, few studies addressed its tolerability or its oral use. The aim of this study was to obtain data related to pharmacokinetics and distribution of diclofenac sodium in synovial fluid after oral or topical administration in healthy ponies as well as to evaluate the tolerability of oral and topical diclofenac sodium administered on a frequency similar to a treatment period. Healthy ponies were divided into three groups and treated with topical (group I, n = 6) or oral (group II, n = 6) diclofenac at a dose of 2.5 mg kg<sup>-1</sup> and oral phenylbutazone (group III, n = 3) at a dose of 2.2 mg kg<sup>-1</sup>. To evaluate the bioavailability blood samples were collected at different times, from 30 minutes to 144 hours and synovial fluid samples 6, 12 and 24 hours, after starting treatment. Blood samples collected 24 hours before and until 144 hours after starting treatment were used for CBC, WBC, biochemical and coagulation profiles. A significant difference was found between group I and group II on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, total leukocytes, neutrophils, band cells, lymphocytes, eosinophils, and alkaline phosphatase. Similar results were found between group II and group III, however, the activated partial thromboplastin time did not differ. Even though the plasma concentration of diclofenac sodium was higher in group II than in group I, the synovial concentration tended to be higher in group I. The diclofenac bioavailability and tolerability data obtained in ponies showed that the topic administration delivered therapeutic concentrations of diclofenac and proved to be safer, as the oral administration resulted in blood changes.

Key words: pharmacokinetics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, horses, high performance liquid chromatography (HPLC), concentration.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Média±DE do hematócrito (A), eritrócitos (B), hemoglobina (C), leucócitos (D), segmentados (E), bastonetes (F), tempo de protrombina (G), tempo de tromboplastina parcial ativada (H) e fibrinogênio (I) dos pôneis tratados com diclofenaco tópico (grupo I), diclofenaco oral (grupo II) e fenilbutazona (grupo III) ( $p < 0,05$ ). Asteriscos na cor azul e vermelho representam diferença significativa entre o grupo II e I ou entre o grupo II e III, respectivamente. .... 34

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1: Biodisponibilidade plasmática (n=6) e sinovial (n=3) do diclofenaco de sódio (média±desvio padrão), após administração tópica (Grupo I) e oral (Grupo II) de 2,5 mg kg <sup>-1</sup> duas vezes ao dia por três dias.....	33
---	----



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Diclofenaco de sódio.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Administração e absorção oral .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Administração e absorção cutânea.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Biodisponibilidade.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. Tolerabilidade .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Uso potencial na medicina esportiva equina .....</b>	<b>17</b>
<b>3. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>18</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) está entre as patologias mais prevalentes e debilitantes que afetam os equinos, tendo um impacto econômico notável na indústria equina. Vários medicamentos são utilizados no tratamento da OA, incluindo não esteróides (AINEs), corticóides e ácido hialurônico. Os AINEs são fármacos rotineiramente utilizados como a primeira e mais importante linha de tratamento de OA, tanto em humanos quanto em equinos (BERTONE et al., 2002; HARVEY & HUNTER, 2008; FRISBIE et al., 2009).

Existem, atualmente, várias classes de AINEs com uma variação significativa nas propriedades farmacológicas de cada medicamento. Embora as numerosas formulações sejam eficazes no tratamento da OA, há também uma grande variação na resposta individual de cada paciente a determinado medicamento. Não existem dados claros sobre a potência de vários AINEs, embora a indometacina e o diclofenaco, em humanos, e a fenilbutazona, em equinos, sejam consideradas os mais eficazes (GOODRICH & NIXON, 2006; HARVEY & HUNTER, 2008).

Em humanos o diclofenaco de sódio já foi o medicamento mais prescrito em todo o mundo (PATRONO & ROCCA, 2009), utilizado principalmente para o alívio da dor e inflamação em condições como artrite reumatóide, OA, espondilite anquilosante e após alguns procedimentos cirúrgicos (SAVAŞER et al., 2005). Em animais, o diclofenaco já foi estudado em cães, bovinos, búfalos, ovelhas, suínos (EMEA, 2003; ALTAHER et al., 2006; AKTARUZZAMAN et al., 2008) e equinos (SCHLEINING et al., 2008; FRISBIE et al., 2009). Ao contrário da via parenteral e enteral em outras espécies, em equinos apenas a aplicação tópica foi estudada.

Os estudos sobre a utilização tópica do diclofenaco conduzidos na espécie equina tratam em sua maioria da biodisponibilidade, da concentração do fármaco no local de ação e do efeito clínico da medicação (CALDWELL et al., 2004; ANDERSON et al., 2005). A tolerabilidade frente ao uso tópico do diclofenaco tem sido pouco abordada. Quanto à utilização por via oral do diclofenaco de sódio, ainda não há trabalhos publicados sobre biodisponibilidade e tolerabilidade.

Com o objetivo de preencher estas lacunas foram coletadas informações relacionadas à biodisponibilidade sanguínea e distribuição do diclofenaco de sódio no líquido sinovial, após a administração oral ou tópica em pôneis sadios. Também foi avaliada a tolerabilidade do

diclofenaco de sódio administrado, usando uma frequência de administração semelhante a um período de tratamento, comparando-o com a fenilbutazona, considerada o tratamento anti-inflamatório padrão para sinovite e OA em equinos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Diclofenaco de sódio

O diclofenaco de sódio é um AINE, derivado do ácido fenilacético, que possui um potente efeito anti-inflamatório, analgésico e antipirético (SAVAŞER et al., 2005; McCORMACK & SCOTT, 2008). Sua atuação se dá mediante uma potente inibição da síntese de prostaglandina e tromboxanos, através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) (McCORMACK & SCOTT, 2008). O diclofenaco é considerado um inibidor não seletivo da COX e da lipoxigenase (ANDERSON et al., 2005). BURIAN et al. (2003) também descrevem a atividade antinociceptiva tanto central quanto periférica do diclofenaco de sódio. Em seres humanos e animais, o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do diclofenaco não pode ser explicado, diretamente, pela concentração circulante, sugerindo que esses efeitos dependem dos níveis de AINE no local da lesão, que pode diferir dos níveis presentes na circulação sanguínea (TORRES-LÓPEZ et al., 1997).

No caso do diclofenaco, existem evidências de que este medicamento é transferido através da membrana sinovial até o líquido sinovial, a partir do qual é eliminado de forma mais lenta do que do plasma (TORRES-LÓPEZ et al., 1997). Talvez, por esta razão, LYNN et al. (2004) e FRISBIE et al. (2009) creditam ao diclofenaco de sódio a capacidade de modificar o processo patológico existente na OA. No entanto o mecanismo pelo qual isto ocorre permanece desconhecido. Estas qualidades aumentam o interesse pelo seu uso terapêutico em equinos.

O diclofenaco de sódio tem por características químicas ser pouco higroscópico, levemente ácido e levemente solúvel em água, estando sua solubilidade relacionada ao pH do meio. Em humanos o diclofenaco se liga fortemente às proteínas plasmáticas, principalmente albumina, na ordem de 99%. Aproximadamente 65% dos seus metabólitos é excretada por via urinária e 35% por via biliar (KINCL et al., 2003; ROBERTS & MORROW, 2003; SU et al., 2003).

## 2.2. Administração e absorção oral

O diclofenaco de sódio é bem absorvido após administração oral. No entanto, o metabolismo de primeira passagem no fígado pode reduzir a biodisponibilidade em 50 a 60% da dose administrada. Em ratos e cães, ao contrário dos humanos, acontece a recirculação entero-hepática do diclofenaco devido à excreção biliar da droga na forma inalterada (PERIS-RIBERA et al., 1991). Em condições ácidas, como a encontrada no líquido gástrico ele sofre ionização, o que dificulta sua solubilização e posterior absorção. Ele, porém, se dissolve bem no fluido intestinal, o que possibilita a sua absorção ao longo do trato gastrointestinal. (PERIS-RIBERA et al., 1991; SAVAŞER et al., 2005).

A velocidade do esvaziamento gástrico é um importante determinante da absorção das medicações, já que o intestino delgado é o principal local de absorção de drogas administradas por via oral, independente de serem ácidos fracos, bases fracas ou compostos neutros. O esvaziamento gástrico depende de vários fatores fisiológicos, além de ser influenciado pelo volume e pela composição do conteúdo gástrico. Logo, alterações no esvaziamento ou na motilidade intestinal são importantes em relação à absorção de drogas pouco solúveis (BAGGOT, 1992). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram claramente que os alimentos influenciam na absorção de vários AINEs (fenilbutazona, cetoprofeno e flunixin). A administração destes fármacos a equinos que não passaram por jejum resultou em reduzida biodisponibilidade (VILLA et al., 2007).

## 2.3. Administração e absorção cutânea

Em teoria, os AINEs quando aplicados topicamente podem atingir concentrações terapêuticas nos tecidos subjacentes ao local de aplicação, mantendo baixas as concentrações séricas. Isso pode oferecer inúmeros benefícios para os pacientes, como a redução do risco de efeitos adversos e também o benefício econômico no tratamento de cavalos com doenças osteomusculares, sinovites e OA (HEYNEMAN et al., 2000; CALDWELL et al., 2004). Acredita-se que em tecidos inflamados os AINEs penetrem mais facilmente, sendo lentamente removidos do exsudato inflamatório, de modo que sua concentração passa a ser maior no exsudato inflamatório do que no plasma (BERTONE et al., 2002). Esta característica está relacionada a alta afinidade que o fármaco tem de se ligar a albumina, que é a principal proteína presente no exsudato inflamatório (DAY et al., 1999). O diclofenaco de sódio também

é capaz de chegar a estruturas mais profundas como o espaço articular (BERTONE et al., 2002).

A eficácia de uma formulação tópica depende da capacidade desta em alcançar concentrações efetivas do fármaco na biofase, ou seja, seu local de ação (VILLARINO et al., 2006). A liberação do princípio ativo desde a formulação aplicada na superfície da pele até seu transporte para a circulação sistêmica ou local de ação é um processo que inclui diversos passos (VILLARINO & LANDONI, 2006).

O extrato córneo queratinizado é a camada exterior da pele, que consiste principalmente de multilâminas hidrofóbicas e canais hidrofílicos. Ele é composto por cadeias apolares de ácidos graxos e por grupos de cabeças polares, atuando como uma barreira eficaz à passagem de substâncias para o corpo. Assim, o fármaco ideal para a administração tópica deve ter baixo peso molecular, ser potente e ter propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas. Além disso, o melhor sistema para aplicação tópica deveria liberar a droga para a pele a uma taxa inferior que a taxa máxima de transporte da pele. Esse controle da variabilidade na permeabilidade da pele entre indivíduos asseguraria uma taxa de liberação constante (HEYNEMAN et al., 2000). Após a administração tópica os fármacos podem penetrar a pele por diferentes vias, se concentrar localmente e/ou penetrar a corrente sanguínea. A penetração do fármaco através do extrato córneo é um processo lento, seguido de uma rápida difusão através da epiderme e da derme papilar (VILLARINO & LANDONI, 2006). As duas principais vias de transporte dos medicamentos dentro e através da pele são a via transepidérmica, através do extrato córneo, e a via transfolicular, através das unidades pilossebáceas e seus anexos.

A penetração de um fármaco pode ser afetada por vários fatores, tais como a espessura da pele, estrutura química do princípio ativo, região anatômica e característica da formulação. Estes fatores são determinantes para a penetração dos fármacos através da pele e podem ser divididos de acordo com seu determinante primário em dependentes do paciente, do princípio ativo e da formulação. Estes fatores podem modificar a penetração de medicamentos através da pele e, portanto, as concentrações efetivas do fármaco no local de ação, que resultam em sua eficácia clínica (VILLARINO et al., 2006; VILLARINO & LANDONI, 2006).

Existem fármacos que não são apropriados para a aplicação cutânea. Isto pode ser o resultado de diversos fatores, tais como características físico-químicas ou cinético-dinâmicas (RIVIERE & PAPICH, 2001).

Dentre os fatores dependentes do paciente os principais são: estruturas que funcionam como barreira, como o extrato córneo; espécie e idade do animal, pH da pele, temperatura

corporal, estado de hidratação da pele, metabolismo epidermal das drogas, secreções corporais e localização anatômica. Dos fatores inerentes ao fármaco o peso molecular, tamanho molecular, grau de ionização e solubilidade são os fatores mais importantes. Já entre os fatores dependentes das formulações os principais são o tipo de formulação, veículo e estrutura química do fármaco utilizado (VILLARINO & LANDONI, 2006).

Nos Estados Unidos já existe uma formulação de diclofenaco de sódio de administração tópica aprovada pelo órgão regulador, *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento de cavalos com OA. Esta formulação alcança concentrações locais elevadas de diclofenaco, sem alcançar concentrações clinicamente importantes no sangue, atenuando os possíveis efeitos adversos associados a administração sistêmica do fármaco (FRISBIE et al., 2009). Esta formulação de diclofenaco lipossomal foi projetada para administração tópica, por conter um sistema de vesículas fosfolipídicas que permitem que o medicamento ativo penetre na pele intacta (BERTONE et al., 2002). Estudos em animais de laboratório revelam que quando o diclofenaco é incorporado em lipossomas, ele penetra rapidamente na pele, mas é eliminado mais lentamente do tecido subcutâneo do que o mesmo medicamento quando aplicado a partir de uma formulação em gel (FRISBIE et al., 2009).

Apesar da via tópica ainda ser pouco explorada como via de aplicação de medicamentos na medicina veterinária ela oferece inúmeras vantagens como diminuição da dose, evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado, evita a via gástrica reduzindo tanto o potencial de degradação prematura do fármaco quanto o de irritação gástrica, possibilidade de aplicar medicamentos sem a necessidade de abrasão do epitélio e também facilidade no manejo da formulação aplicada. Ela é, portanto uma via prática, segura e menos invasiva do que as outras vias (MILLS & CROSS, 2006; VILLARINO & LANDONI, 2006).

## **2.4. Biodisponibilidade**

A biodisponibilidade é um importante conceito e está relacionada à quantidade de medicamento que atinge a circulação sanguínea. Ela é importante, pois estes dados são utilizados para determinar a quantidade de medicamento absorvido, a velocidade de absorção e o tempo de permanência do medicamento nos líquidos do organismo e sua correlação com as respostas farmacológicas (FLORIO, 2002).

A biodisponibilidade de um medicamento pode ser caracterizada de maneira adequada mediante a determinação de três parâmetros a partir do perfil de concentração plasmática e

tempo do fármaco no organismo: concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ), tempo decorrido para alcançá-la ( $T_{max}$ ) e área sob a curva (AUC) (BAGGOT, 1992).

A  $C_{max}$  representa a concentração mais elevada no compartimento intravascular após a administração do medicamento. O  $T_{max}$  representa o intervalo de tempo necessário para que ocorra o pico de concentração máxima; este parâmetro tem íntima relação com a velocidade de absorção do medicamento. A AUC de concentração representa a quantidade de medicamento absorvido após administração da droga e é matematicamente calculada pela determinação da área trapezoidal sob a curva (FLORIO, 2002).

Estudos *in vivo* mostram que AINEs tópicos penetram lentamente e em pequenas quantidades na circulação geral, sendo que a  $C_{max}$  geralmente é 5 a 15% menor que a  $C_{max}$  encontrada após administração oral de uma dose equivalente. As  $C_{max}$  após administração tópica permanecem uniformemente abaixo da concentração terapêutica aceita para os AINEs, o que é importante do ponto de vista de toxicidade sistêmica. O  $T_{max}$  é aproximadamente 10 vezes maior do que o da administração oral (HEYNEMAN et al., 2000).

Estudos de biodisponibilidade sugerem que os AINEs administrados topicamente atingem apenas 3 a 5% da absorção sistêmica possível quando da administração de uma dose equivalente por via oral. (HEYNEMAN et al., 2000).

RADERMACHER et al. (1991) concluíram que a aplicação tópica de diclofenaco gel nas articulações do joelho, de pessoas, dá origem a concentrações de diclofenaco no plasma e líquido sinovial inferiores as observadas após a administração oral ou parenteral. Já KIENZLER et al. (2010) utilizando diclofenaco de sódio, em humanos, observaram uma  $C_{max}$  após a administração oral aproximadamente 151 vezes superior a  $C_{max}$  após a administração tópica. A quantidade de medicamento absorvido, representado pela  $AUC_{0-24}$  foi em torno de 16,7 vezes maior na administração oral, no entanto, conforme esperado, o  $T_{max}$  foi aproximadamente 2,15 vezes superior quando da aplicação tópica.

Em relação à dinâmica dos AINEs no líquido sinovial percebe-se que estes se difundem lentamente entre o plasma e o líquido sinovial. Esta pequena difusão leva a maiores concentrações de AINEs no líquido sinovial do que no plasma, principalmente, se a meia-vida de eliminação é curta. A concentração média de muitos AINEs no líquido sinovial permanece a uma taxa constante de 60% deste no plasma (DAY et al., 1999).



## 2.5. Tolerabilidade

A administração crônica de AINEs pode causar alguns efeitos adversos. Os mais comuns são flebite e necrose tecidual no local da injeção, ulceração gastrointestinal, nefrotoxicidade, anorexia, hipoproteinemia e inibição da agregação plaquetária (BERTONE et al., 2002; SCHLEINING et al., 2008, FRISBIE et al., 2009, KIENZLER et al., 2010). Os AINEs atuam mediante a supressão da síntese de prostaglandinas pela enzima COX, que apresenta duas isoenzimas distintas, uma expressa constitutivamente (COX-1) e uma induzível (COX-2) (GOODRICH & NIXON, 2006).

A partir destas duas isoenzimas são produzidos diferentes prostanóides, como: tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e PGE<sub>2</sub>. Os efeitos colaterais são decorrentes da inibição da síntese de algumas destas classes de prostanóides, principalmente TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> (TASAKA, 2002; RADI & KHAN, 2006).

Alguns prostanóides, incluindo TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, ajudam a regular o tônus vascular e a agregação plaquetária através da atividade da COX. TXA<sub>2</sub> é um prostanóide vasoconstritor derivado das plaquetas, COX-1 dependente, que promove adesão e agregação plaquetária. PGI<sub>2</sub> é derivada do endotélio e tem função de evitar a agregação plaquetária, no entanto é COX-1 e COX-2 dependente (TASAKA, 2002; RADI & KHAN, 2006).

As prostaglandinas PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> normalmente possuem ação vasodilatadora nos rins, além de atuarem na liberação de renina e na transferência de eletrólitos. A inibição destas promove a diminuição do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular. Na mucosa gástrica a ação vasodilatadora fisiológica das PGs, principalmente da PGE<sub>2</sub>, estimula o sistema de tamponamento pelo bicarbonato que atenua a ação corrosiva do ácido clorídrico (HCl) presente no suco gástrico. Quando estas PGs são inibidas pelos anti-inflamatórios, ocorre erosão da mucosa devido à redução na neutralização do HCl. Outro possível mecanismo é o acúmulo dos AINEs dentro das células gástricas, levando à morte celular. Inicialmente, a acidez gástrica facilita a penetração destes fármacos na mucosa, na forma molecular. No interior da célula, a substância retorna à forma ionizada, o que a aprisiona dentro da célula causando toxicidade direta. (TASAKA, 2002).

KIENZLER et al. (2010) relatam que em humanos a administração oral de diclofenaco de sódio é capaz de inibir substancialmente a enzima COX-1 e a agregação plaquetária, no entanto a aplicação tópica do diclofenaco de sódio afeta minimamente estes parâmetros. A inibição da COX-1 a uma taxa superior a 95% é potencialmente perigosa por afetar a função plaquetária, a proteção gastrointestinal ou a manutenção da função renal.

Em equinos o diclofenaco de sódio administrado topicamente foi bem tolerado, visto que nenhum efeito adverso foi observado tão pouco houve alteração nos exames de hemograma e bioquímica sanguínea (BERTONE et al., 2002). No entanto pouco se sabe sobre a tolerabilidade dos equinos frente à utilização oral do diclofenaco de sódio.

## **2.6. Uso potencial na medicina esportiva equina**

Na medicina humana a utilização de diclofenaco de sódio por via tópica tem se mostrado eficiente no alívio da dor em curto prazo, com eficácia comparável ao diclofenaco oral (HARVEY & HUNTER, 2008; SIMON et al., 2009). A taxa de efeitos adversos foi baixa e similar à utilização do diclofenaco tópico e oral, sendo que apenas o diclofenaco oral foi associado com efeitos gastrointestinais (KIENZLER et al., 2010).

Embora não existam produtos com diclofenaco de sódio aprovados para administração oral ou parenteral em equinos, o FDA aprovou uma formulação com diclofenaco a 1% para aplicação tópica em cavalos utilizada no controle da dor e inflamação articular associadas à OA (ANDERSON et al., 2005). Estudos realizados com a aplicação tópica de diclofenaco a 1% demonstram que ele é seguro e efetivo para o tratamento de equinos com claudicação associada à doença articular (BERTONE et al., 2002). LYNN et al. (2004) e FRISBIE et al. (2009) citam o diclofenaco tópico como uma opção terapêutica viável no manejo de OA em cavalos, por ele ser considerado um fármaco modificador da doença e dos sinais clínicos. Portanto este AINE aplicado topicamente pode se tornar uma nova alternativa terapêutica no tratamento de uma ampla variedade de lesões musculoesqueléticas e inflamatórias dos equinos (ANDERSON et al., 2005).

Por ser um AINE, o diclofenaco de sódio tem sua utilização regulamentada pela maioria dos programas de controle de medicamentos de equinos em competição. Nos Estados Unidos, por exemplo, a *United States Equestrian Federation (USEF)* permite que o diclofenaco esteja presente no soro a uma concentração que não exceda  $5\text{ng ml}^{-1}$ . Já o regulamento regido pela Federação Equestre Internacional (FEI) não permite a presença de nenhum traço de diclofenaco nos animais em competição (ANDERSON et al., 2005). É importante que o veterinário tome conhecimento destes regulamentos consultando as autoridades regulamentadoras a fim de esclarecer os níveis máximos permitidos e o tempo no qual o tratamento deve ser interrompido a fim de evitar que concentrações acima do permitido sejam encontradas no animal.

### **3. CAPÍTULO 1**

**TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:**

#### **BIODISPONIBILIDADE E TOLERABILIDADE DO DICLOFENACO DE SÓDIO VIA TÓPICA OU ORAL EM PÔNEIS SADIOS**

**Marcos da Silva Azevedo, Flávio Desessards De La Côte**

**CIÊNCIA RURAL, 2011**

**Biodisponibilidade e tolerabilidade do diclofenaco de sódio via tópica ou oral em  
pôneis sadios**

**Bioavailability and tolerability of topic and oral diclofenac sodium in healthy  
ponies**

**Marcos da Silva Azevedo<sup>I</sup>, Flávio Desessards De La Corte<sup>II</sup>**

**RESUMO**

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar a farmacocinética e avaliar a segurança da administração tópica e oral do diclofenaco de sódio em pôneis sadios. Pôneis clinicamente sadios foram divididos em três grupos e tratados com diclofenaco por via tópica (grupo I, n=6) e oral (grupo II, n=6), na dose de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> e fenilbutazona oral (grupo III, n=3) na dose de 2,2 mg kg<sup>-1</sup>. Para avaliar a biodisponibilidade amostras de sangue foram coletadas 0,5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas, após o início do tratamento. Já para avaliar a concentração de diclofenaco de sódio local, foram coletadas amostras de líquido sinovial 6, 12 e 24 horas após o início do tratamento (grupo I, n=3; grupo II, n=6). Hemograma, leucograma, bioquímico e coagulograma foram realizados nas amostras de sangue colhidas antes e 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após início do tratamento. A concentração plasmática do diclofenaco de sódio no grupo II foi mais elevada que no grupo I, no entanto a concentração sinovial foi maior no grupo I. Diferenças foram observadas entre o grupo II e o grupo I em determinados tempos no tempo de protrombina, tempo de trombolastina parcial ativado, fibrinogênio, hematócrito, hemoglobina, hemácias, leucócitos totais, segmentados, bastonetes, linfócitos, eosinófilos e fosfatase alcalina. Resultados

---

<sup>I</sup> Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>II</sup> Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Hospital Veterinário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. e-mail: delacorte2005@yahoo.com.br \*Autor para correspondência

semelhantes foram encontrados entre o grupo II e o grupo III, no entanto o tempo de tromboplastina parcial ativado não apresentou diferença significativa.

**Palavras-chave:** farmacocinética, anti-inflamatório não esteroidal, equinos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), concentração.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to characterize the pharmacokinetics and assess the safety of topical and oral treatment of diclofenac sodium in healthy ponies. Healthy ponies were divided into three groups and treated with topical (group I, n = 6) and oral diclofenac (group II, n = 6) at a dose of 2.5 mg kg<sup>-1</sup> and 2.2 mg kg<sup>-1</sup> oral phenylbutazone (group III, n = 3) during three days. To evaluate bioavailability blood samples were collected 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 and 144 hours, after starting treatment. To evaluate local concentration of diclofenac sodium, samples of synovial fluid were collected 6, 12 and 24 hours after initiation of treatment.

Blood samples collected before and 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours after starting treatment were used for CBC, WBC, biochemical and coagulation profiles. A difference was found between group I and II on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, total leukocytes, neutrophils, band cells, lymphocytes, eosinophils, and alkaline phosphatase. Similar results were found between group II and III, however, activated partial thromboplastin time did not differ. Plasma concentration of diclofenac sodium in group II was higher than in group I. Synovial concentration was higher than the minimal therapeutic levels in group I.

**Key words:** pharmacokinetics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, horses, high performance liquid chromatography (HPLC), concentration.

## **INTRODUÇÃO**

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados no tratamento da dor e inflamação em cavalos, apesar dos seus possíveis efeitos adversos quando usados por longos períodos via sistêmica. A administração crônica destes AINEs pode causar flebite, ulceração gastrointestinal, nefrotoxicidade e inibição da agregação plaquetária (SCHLEINING et al., 2008; KIENZLER et al., 2010).

A administração tópica de AINEs pode ser terapêuticamente eficaz sem apresentar efeitos colaterais (VILLARINO et al., 2006) pela exposição sistêmica mínima (FRISBIE et al., 2009). Mais ainda, o efeito terapêutico parece estar relacionado à ação local da molécula do AINE, após sua penetração na pele sobre os locais de inflamação e dor (VILLARINO et al., 2006).

O diclofenaco de sódio é um AINE, derivado do ácido fenilacético, utilizado no alívio da dor e inflamação em seres humanos, sendo administrado, mais frequentemente, via oral, intravenosa, intramuscular e tópica. Sua atuação se dá mediante uma potente inibição da síntese de prostaglandina e tromboxanos, através da inibição das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (McCORMACK & SCOTT, 2008; ANDERSON et al., 2005). Os efeitos anti-inflamatório e antinociceptivos do diclofenaco não podem ser diretamente explicados pela concentração circulante, sugerindo que esses efeitos dependem dos níveis de AINE no local da lesão, que pode diferir dos níveis presentes na circulação sanguínea (TORRES-LÓPEZ et al., 1997). Segundo BERTONE et al. (2002), o diclofenaco de sódio também é capaz de chegar a estruturas mais profundas como o espaço articular. FRISBIE et al. (2009) creditam ao diclofenaco de sódio a capacidade de modificar o processo patológico existente na osteoartrite, no entanto o mecanismo pelo qual isto ocorre permanece desconhecido.

O diclofenaco de sódio vem sendo administrado intensamente no tratamento de várias doenças artríticas no homem e, mais recentemente, em cavalos. No entanto, há muitas

divergências quanto ao seu efeito clínico, sua concentração no líquido sinovial e sua segurança (MOORE, 2005; VILLARINO et al., 2006), motivo pelo qual se procurou caracterizar a biodisponibilidade e avaliar a segurança da administração tópica e oral do diclofenaco de sódio em pôneis sadios.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Dezoito pôneis machos inteiros, clinicamente sadios, com peso médio de  $188,75 \pm 24,06$  kg e idade média de  $7 \pm 2$  anos, foram submetidos a exame clínico geral e específico para descartar a presença de qualquer alteração sistêmica ou articular no tarso. Os animais foram mantidos em baias recebendo feno de alfafa e água *ad libitum* durante o experimento.

No dia anterior ao início do experimento os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em três grupos. Posteriormente foi realizada tricotomia da área sobre a jugular esquerda para facilitar a punção venosa. Os animais que receberam diclofenaco por via tópica tiveram o tarso direito lavado com água e sabão, sem tricotomia.

No primeiro dia do experimento foram colhidas amostras de sangue dos animais (T0) para realização de hemograma, leucograma, bioquímico, coagulograma e concentração plasmática do fármaco. Em seguida foi aplicada uma pomada contendo diclofenaco de sódio a 7%, propilenoglicol 5%, natrosol 2% e nipagin 0,2%, nos animais do grupo I. A dose utilizada foi de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , sendo que os animais, deste grupo, receberam em média  $6,7 \pm 0,8$  gramas de pomada. Para a aplicação tópica do diclofenaco de sódio foi seguido o protocolo descrito por VILLARINO et al. (2006) que consiste na aplicação mediante massagem sobre a área dorsal do tarso por 2 minutos. Os animais do grupo II receberam diclofenaco de sódio por via oral, na dose de  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  semelhante ao proposto pela EMEA (2003). Já os animais do grupo III receberam  $2,2 \text{ mg kg}^{-1}$  de fenilbutazona oral servindo de controle positivo para o estudo, pois a fenilbutazona é considerada o tratamento padrão para osteoartrite em equinos a muitas

décadas, tendo sua biodisponibilidade e tolerabilidade bem estabelecida (GOODRICH & NIXON, 2006). Ambos os grupos foram tratados duas vezes ao dia, por três dias.

Após a limpeza da pele com álcool foram coletados e acondicionados em tubos com EDTA 4ml de sangue através de punção da veia jugular esquerda, com agulha 21g e seringas de 5ml, nos tempo de 0,5, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas após o início do tratamento (VILLARINO et al., 2006). O plasma foi obtido por centrifugação do sangue total a 716,8g durante 10 minutos. Após a sua separação, 3ml de plasma foram armazenados em tubos de polipropileno e estocados a  $-80^{\circ}$  C. Posteriormente estas amostras foram analisadas através do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para avaliar a concentração plasmática de diclofenaco.

Às 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após início do tratamento também foi colhido sangue (12ml) da forma descrita, para realização de hemograma completo, bioquímico e coagulograma. Para o hemograma e o bioquímico o sangue foi acondicionado em tubos com EDTA e sem anticoagulante, respectivamente. Fosfatase alcalina (FA), gamaglutamiltransferase (GGT), transaminase oxalacética (TGO), uréia (BUN) e creatinina (CR) foram analisadas no soro. A mensuração do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), tempo de protrombina (TP) e fibrinogênio, para o coagulograma, foi realizado em sangue armazenado em tubos contendo citrato de sódio a 3,2%.

Após cada pônei ser sedado com xilazina a 10% ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e ser realizada a antisepsia com iodo povidona seguida de álcool, sobre a articulação tíbiotarsiana direita, o líquido sinovial (3ml) foi coletado (T0 e após 6, 12 e 24 horas) usando uma agulha 22g e armazenado em tubos de polipropileno com EDTA. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 716,8g e o sobrenadante foi armazenado a  $-80^{\circ}$  C para posterior análise por HPLC.



Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas seguidos do teste de Bonferroni para avaliação das médias entre os grupos e entre os tempos no mesmo grupo. Os valores com  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

**Biodisponibilidade** – A tabela 1 apresenta o resumo dos dados de biodisponibilidade quanto à distribuição plasmática e sinovial do diclofenaco de sódio após administração tópica e oral. A análise da concentração sinovial de diclofenaco de sódio foi realizada apenas em três animais de cada um dos grupos de aplicação tópica devido a dificuldade para coletar líquido sinovial do pôneis menores.

**Tolerabilidade** – Serão apresentadas apenas as variáveis que apresentaram diferença significativa, com  $P \leq 0,05$ .

**Hemograma** – O hematócrito e a concentração de hemoglobina apresentaram valores mais elevados no grupo II que no grupo I as 48, 72, 96, 120 e 144 horas. No entanto, o grupo II apenas apresentou hematócrito mais elevado que o grupo III as 72 e 144 horas e hemoglobina as 48, 72 e 144 horas (Figura 1-A E 1-C). A contagem de eritrócitos foi mais alta no grupo II do que no grupo I e III as 48, 72 e 96 horas (Figura 1-B).

**Leucograma** – O número de leucócitos totais diferiu entre o grupo II e I e entre o grupo II e III as 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 1-D). Esta diferença foi caracterizada pela leucopenia observada nos animais do grupo II. Número de segmentados menor no grupo II que no I e no grupo II que no III, foi encontrado as 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 1-E). Os bastonetes apareceram em maior numero no grupo II que no I as 72 e 144 horas e que no grupo III as 144 horas (Figura 1-F).

**Coagulograma** – O TP apresentou níveis superiores às 144 horas no grupo II que no grupo I e III (Figura 1-G). Já o TTPA variou às 72 horas apenas entre o grupo II e I (Figura 1-H). Houve uma elevação na concentração de fibrinogênio no grupo II em relação ao grupo I e III

as 72 e 96 horas (Figura 1-I). Não houve variação na contagem de plaquetas entre os grupos avaliados.

**Bioquímico** – os níveis séricos de GGT, TGO, uréia e creatinina não sofreram variações com o tratamento, no entanto a FA apresentou valores enzimáticos mais elevados no grupo II que no grupo I e III as 120 e 144 horas.

## **DISCUSSÃO**

A aplicação cutânea de diclofenaco de sódio resultou em concentrações no líquido sinovial superiores à concentração anti-inflamatória mínima. Houve uma tendência da concentração sinovial após aplicação tópica ser superior á administração oral. A variação existente na concentração sinovial de diclofenaco no grupo I pode estar relacionada ao pequeno número de amostras (n=3) e a variação individual nas concentrações obtidas do líquido sinovial. HEYNEMAN et al. (2000) citam que AINES aplicados topicamente atingem concentrações terapêuticas nos tecidos subjacentes ao local da aplicação, enquanto as do soro ou plasma permanecem baixas. De acordo com CALDWELL et al. (2004) é necessária uma concentração mínima de  $76,2\text{ng mL}^{-1}$  para reduzir significativamente a produção de  $\text{PGE}_2$  em tecidos inflamados, concentração esta que é muito inferior a concentração de diclofenaco no líquido sinovial encontrada em nosso trabalho, tanto após administração tópica quanto oral do diclofenaco de sódio.

A concentração máxima no líquido sinovial (Tabela 1) observada neste trabalho com a utilização tópica de diclofenaco de sódio a 7% foi bastante superior a encontrada por outros autores ao utilizarem uma pomada de diclofenaco a 1% em equinos. VILLARINO et al. (2006), por exemplo, encontrou  $80\text{ng mL}^{-1}$  e SCHLEINING et al., (2008)  $3,36\text{ ng mL}^{-1}$ . A maior absorção observada em nosso estudo pode ser atribuída, em parte, à dose, já que esta foi adequada ao peso de cada animal, ao contrário de outros trabalhos (SCHLEINING et al., 2008; VILLARINO et al., 2006). A quantidade média de fármaco disponibilizada pela

aplicação da pomada a 7% foi de 471,88mg de diclofenaco, ao passo que nos outros trabalhos (SCHLEINING et al., 2008; VILLARINO et al., 2006) esta quantidade foi de 72mg de diclofenaco de sódio para cada aplicação, independente do peso do animal.

A formulação e o veículo podem ter influenciado a quantidade absorvida, pois a formulação utilizada por SCHLEINING et al. (2008) e FRISBIE et al. (2009) é composta por lipossomas que prontamente penetram na pele, mas eliminam a droga mais lentamente no tecido subcutâneo, do que o mesmo medicamento na forma de gel (FRISBIE et al., 2009; FERRANTE et al. 2010). Promotores de penetração com características polares como o propilenoglicol, utilizado em nosso estudo, são capazes de se acumular na camada córnea, de tal forma que eles alteram a solubilidade do fármaco no extrato córneo facilitando sua absorção (MAGNUSSON et al., 2004).

RADERMACHER et al. (1991) demonstraram em humanos que a aplicação tópica de diclofenaco gel resulta em concentrações inferiores no plasma e no líquido sinovial que a administração oral ou parenteral desta droga. KIENZLER et al. (2010) encontraram concentrações plasmáticas 40 a 150 vezes maiores após administração oral de diclofenaco de sódio. Esta concentração é capaz de inibir significativamente mais COX-2 em humanos, que a concentração obtida após aplicação de diclofenaco de sódio tópico.

Em nossos resultados a  $C_{max}$  plasmática foi alcançada uma hora após a administração tópica do diclofenaco, já ANDERSON et al. (2005) e VILLARINO et al. (2006) verificaram a  $C_{max}$  as 6 horas. Resultados estes que diferem da  $T_{max}$  plasmática de 48 horas verificado por CALDWELL et al. (2004).

No nosso tratamento a  $C_{max}$  plasmática em pôneis recebendo  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  via oral diverge da observada por SU et al. (2003) e LOTSCH et al. (2000). Essa divergência na  $C_{max}$  e  $T_{max}$  pode ser atribuída à diferenças na absorção entre humanos e equinos devido ao pH gástrico. Como o homem apresenta um pH gástrico mais ácido que o equino o diclofenaco,

um ácido moderadamente fraco, sofre ionização no estômago e com isto a absorção é retardada (PERIS-RIBERA et al., 1991; SU et al., 2003). Os autores desconhecem dados na espécie equina referente à utilização do diclofenaco por via oral.

Analisando a AUC (Tabela 1) pode-se observar a quantidade de fármaco que foi absorvida em determinado intervalo de tempo. Em relação a AUC no líquido sinovial a administração tópica de diclofenaco de sódio proporcionou uma maior absorção comparada a administração oral. No entanto, a AUC plasmática foi superior no grupo II que no grupo I. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que os AINES tópicos penetram lentamente e em pequenas quantidades na circulação geral. Estudos de biodisponibilidade sugerem que os AINES administrados topicamente atingem apenas 3 a 5% da absorção sistêmica possível quando da administração de uma dose equivalente por via oral. (HEYNEMAN et al., 2000). Pesquisas futuras utilizando o dimetilsulfóxido (DMSO) em conjunto com o diclofenaco de sódio são importantes a fim de se avaliar se o DMSO, um carreador de substâncias, aumenta a absorção cutânea do diclofenaco (WILLIAMS & BARRY, 2003).

A administração oral do diclofenaco de sódio em pôneis sadios alterou parâmetros hematológicos, de coagulação e bioquímicos, em relação aos outros grupos de tratamento. A elevação dos parâmetros hematimétricos observados no grupo II se contrapõem aos observados por BARBOSA et al. (2010). A leucopenia e neutropenia significativa observada no grupo II está de acordo com o proposto por ANDRADE & JERICÓ (2002), no entanto diverge dos resultados de BARBOSA et al. (2010) e SÁNCHEZ et al. (2002) que não verificaram diferença na leucometria de ratos. O aumento no hematócrito, eritrócitos, hemoglobina e a diminuição dos leucócitos e neutrófilos pode estar relacionado à existência de uma enteropatia, que além de causar perda de proteína e líquido também mobiliza as células de defesa.

A elevação do fibrinogênio se manteve dentro dos valores de referência (THRALL, 2007). Ao contrário do que ocorre com outras proteínas hemostáticas, o aumento da fibrinogênese é a resposta do fígado a um dano hepatocelular induzido por agentes infecciosos, tóxicos ou metabólicos (GENTRY, 2004).

O TP e TTPA são comumente utilizados como testes de triagem e avaliam de forma global a via extrínseca (TP) e intrínseca (TTPA) da coagulação (NG, 2009). Os tempos de coagulação variaram significativamente entre os grupos analisados apenas em alguns momentos. O TP e TTPA do grupo tratado com diclofenaco de sódio oral foram superiores aos do intervalo de referência (THRALL, 2007). Esta elevação pode estar relacionada à inibição específica dos AINEs sobre a ativação plaquetária. Estes, através da ação inibitória sobre a COX-1 impedem a liberação de TXA<sub>2</sub>. Conseqüentemente ocorre falha na ligação das plaquetas impedindo a agregação plaquetária (SCHAFER, 1999). KIENZLER et al. (2010) relataram um aumento na capacidade de inibição da agregação plaquetária e da COX-1, em razão da maior absorção sistêmica do diclofenaco via oral. A função plaquetária só é prejudicada quando a inibição da COX-1 ultrapassar 95% (REILLY & FITZGERALD, 1987). Este efeito deve ser considerado em processos de laminite, em que ocorre agregação plaquetária (HOOD et al., 1993; WEISS et al., 1997). Portanto, um AINE com efeito maior sobre a COX-1 pode aumentar o efeito anti-agregador de plaquetas, tornando-se uma opção terapêutica nestes casos.

As enzimas GGT e TGO não variaram entre os grupos e entre os tempos. No entanto os valores médios de GGT e TGO no grupo I, II e III se mantiveram acima dos valores de referência (THRALL, 2007). Somente a FA subiu significativamente nos animais do grupo II. BARBOSA et al. (2010) assim como RADERMACHER et al. (1991) em ratos e humanos, respectivamente, não observaram elevação das enzimas hepáticas avaliadas.

Qualquer AINES pode causar lesão hepática, que é, clinicamente, leve. A elevação das transaminases é comumente associada ao uso dos AINES. O diclofenaco de sódio frequentemente, causa elevações leves em qualquer momento do tratamento, bastando um ajuste da dose para reverter este processo (MANDELL, 1999; BARBOSA et al., 2010).

## **CONCLUSÃO**

Em pôneis a biodisponibilidade e tolerabilidade do diclofenaco recomendam a utilização tópica do diclofenaco de sódio para tratamentos articulares, pois esta via atingiu concentrações sinoviais do fármaco superiores as necessárias, além de ser mais segura. O diclofenaco de sódio oral apesar de atingir concentrações plasmáticas e sinoviais adequadas não é recomendado para pôneis, pois induziu alterações no hemograma, leucograma e coagulograma.

## **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número 83/2010.

## **REFERÊNCIAS**

- ANDERSON, D. et al. Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 57-66, 2005.
- ANDRADE, S. F.; JERICÓ, M. M. Anti-inflamatórios. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 89-113.
- BARBOSA, C. M. et al. Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 2, p. 118-126, 2010.
- BERTONE, J. J. et al. Clinical field trial to evaluate the efficacy of topically applied diclofenac liposomal cream for the relief of joint lameness in horse. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. v. 48, p. 190-193, 2002.

CALDWELL, F. J. et al. Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 271–276, 2004.

EMA. **Diclofenaco**. Agência Europeia para Avaliação de Produtos Médicos - Comitê para Produtos Médicos Veterinários, 2003 – Londres, Inglaterra, 2004. 9p. Capturado em 14 jul. 2009. Online. Disponível na internet: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/088503en.pdf>.

FERRANTE, M. et al. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 312-315, 2010. doi:10.1016/j.tvjl.2009.09.010.

FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 210-215, 2009.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal**, v. 168, p.238-251, 2004. doi:10.1016/j.tvjl.2003.09.013.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 51-69, 2006. doi:10.1016/j.tvjl.2004.07.008

HEYNEMAN, C. A. et al. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases : A comparison. **Drugs**, v. 60, n. 3, p.555-574, 2000.

HOOD, D. M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of equine laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 228-234, 1993.

KIENZLER, J. L. et al. Systemic bioavailability of topical diclofenac sodium gel 1% versus oral diclofenac sodium in healthy volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 50-61, 2010. doi: 10.1177/0091270009336234.

- LOTSCH, J. et al. Population pharmacokinetics of fast release oral diclofenac in healthy volunteers: Relation to pharmacodynamics in an experimental pain model. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 77-84, 2000. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03289.x.
- MAGNUSSON, B. M. et al. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 205–227, 2001.
- MANDELL, B. F. General tolerability and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal Of Medicine**, v. 107, p. 72-76, 1999. doi: S0002-9343(99)00370-8.
- McCORMACK, P. L.; SCOTT, L.J. Diclofenac sodium injection (Dyloject®) in postoperative pain. **Drugs**, v. 68, p. 123-130, 2008.
- MOORE, R. A. et al. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of information from company clinical trial reports. **Arthritis Research and Therapy**, v. 3, p. 644-65, 2005. doi: 10.1186/ar1704.
- NG, V. L. Prothrombin time and partial thromboplastin time assay considerations. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, n. 2, p.253-263, 2009. doi:10.1016/j.cll.2009.05.002.
- PERIS-RIBERA, J. E. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of diclofenac in the rat. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 19, n. 6, p. 647-665, 1991.
- RADERMACHER, J. et al. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 537-541, 1991.
- REILLY, I. A.; FITZGERALD, G. A. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs, **Blood**. v. 69, p. 180-186, 1987.
- SÁNCHEZ, S. et al. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenaco in subchronic treatment in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 12, p. 2791-2798, 2002.



SCHAFER, A. I. Effects of nonsteroidal antiinflammatory therapy on platelets. **The American Journal of Medicine**, v. 106, p. 25-36, 1999.

SCHLEINING, J. A. et al. Liposome-based diclofenac for the treatment of inflammation in an acute synovitis model in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, p. 554–561, 2008. doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.00994.x.

SU, S. F. et al. In vitro and in vivo comparison of two diclofenaco sodium sustained release oral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 39-46, 2003. doi: 10.1016/S0378-5173(03)00237-0.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Roca : São Paulo, 2007, 582p.

TORRES-LÓPEZ, J. E. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 685-690, 1997.

VILLARINO, N. F. et al. Inefficacy of topical diclofenac in arthritic horses. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.1, p. 8-12, 2006.

WEISS, D. J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 58, n. 12, p. 1376-1380, 1997.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 603-618, 2004. doi: 10.1016/j.addr.2003.10.025.

Tabela 1 - Biodisponibilidade plasmática (n=6) e sinovial (n=3) do diclofenaco de sódio (média±desvio padrão), após administração tópica (Grupo I) e oral (Grupo II) de 2,5 mg kg<sup>-1</sup> duas vezes ao dia por três dias.

<b>Grupo</b>	<b>C<sub>max</sub>, ng/mL</b>	<b>T<sub>max</sub>, h</b>	<b>AUC<sub>0-t</sub></b>	<b>AUC<sub>0-t</sub> ac.</b>
<b>Plasma</b>				
<b>I</b>	30,56 (±13,04)	1 (0-9h)	70,47 (±25,43) (0-6h)	205,53 (±71,72) (0-9h)
<b>II</b>	1854,76 (±555,51)	1 (0-72h)	2740,28 (±923,29) (0-3h)	12922,27 (±3149,03) (0-72h)
<b>Líquido Sinovial</b>				
<b>I</b>	1689,39 (±793,94)	24 (0-24h)	15553,07 (±9710,03) (0-24h)	17967,11 (±12274,64) (0-24h)
<b>II</b>	1408,45 (±220,14)	24 (0-24h)	10536,47 (±1216,47) (0-24h)	11607,57 (±1311,26) (0-24h)

C<sub>max</sub>, Concentração máxima; T<sub>max</sub>, Tempo para alcançar a C<sub>max</sub>; AUC<sub>0-t</sub>, Área sob a curva no intervalo de tempo determinado; AUC<sub>0-t</sub> ac.; Área sob a curva acumulada no intervalo de tempo determinado.

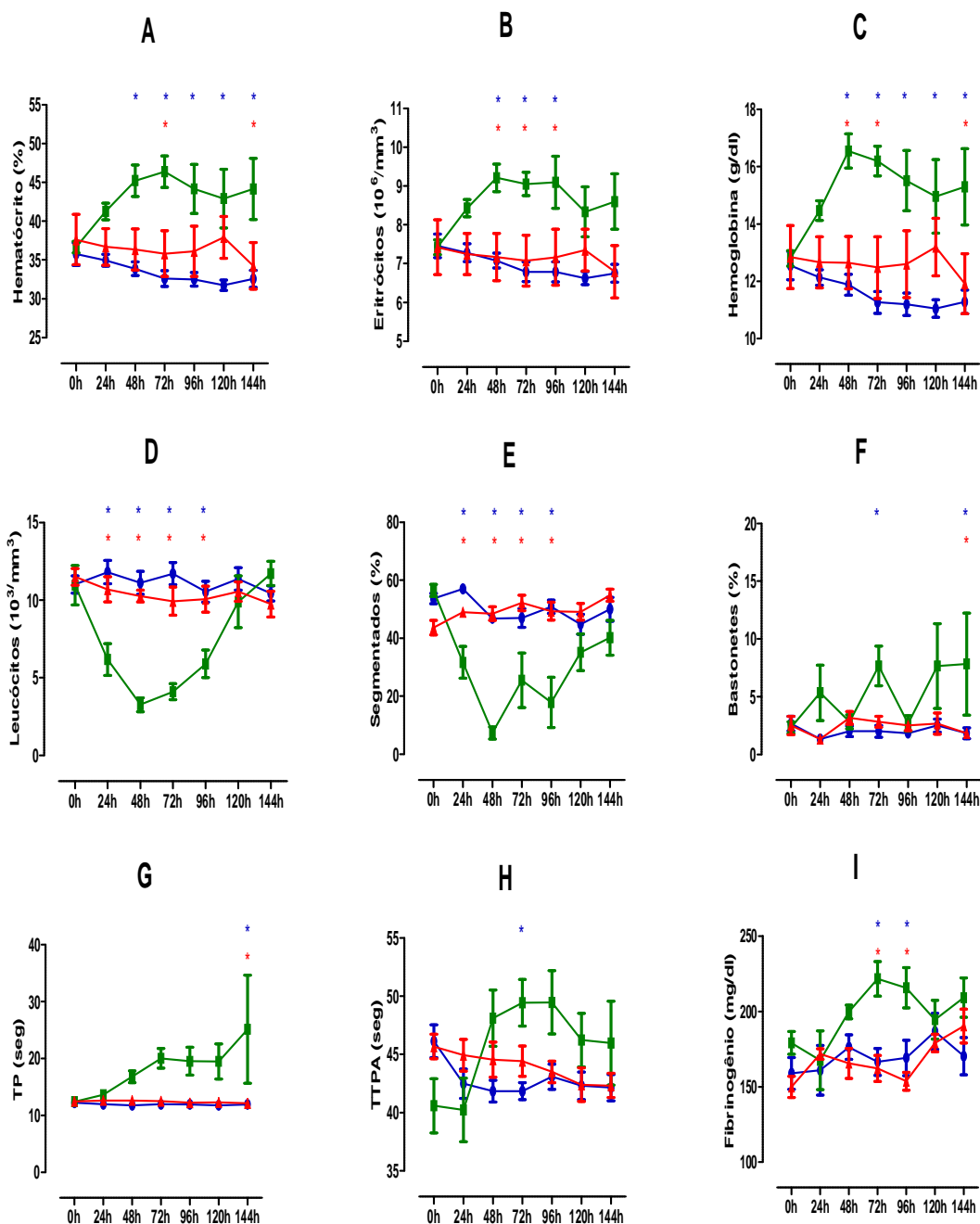


Figura 1 - Média±DE do hematócrito (A), eritrócitos (B), hemoglobina (C), leucócitos (D), segmentados (E), bastonetes (F), tempo de protrombina (G), tempo de tromboplastina parcial ativada (H) e fibrinogênio (I) dos pôneis tratados com diclofenaco tópico (grupo I), diclofenaco oral (grupo II) e fenilbutazona (grupo III) ( $p < 0,05$ ). Asteriscos na cor azul e vermelho representam diferença significativa entre o grupo II (verde) e I (azul) ou entre o grupo II e III (vermelho), respectivamente.

#### **4. CONCLUSÃO**

Em pôneis, a biodisponibilidade e tolerabilidade do diclofenaco se mostrou que a utilização do diclofenaco de sódio por aplicação tópica foi superior à oral, pois foi capaz de proporcionar concentrações sinoviais do fármaco acima dos níveis anti-inflamatórios mínimos necessários, além de se mostrar mais segura para utilização visto que não alterou significativamente os exames realizados.

A aplicação tópica de diclofenaco apresentou características que a tornam uma opção alternativa no tratamento de patologias articulares em equinos.

## 5. REFERÊNCIAS

AKTARUZZAMAN, M. et al. Clinico-haematological effect of selected NSAID in the treatment of experimentally produced myositis in goat. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 6, p. 99-102, 2008.

ALTAHER, A. Y. et al. Pharmacokinetics of diclofenac in sheep following intravenous and intramuscular administration. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 33, p. 241-245, 2006.

ANDERSON, D. et al. Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 57-66, 2005.

ANDRADE, S. F.; JERICÓ, M. M. Anti-inflamatórios. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2th. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 89-113.

BAGGOT, J. D. Distribuição, metabolismo e eliminação das drogas no organismo. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1992. Cap. 5, p. 29-55.

BARBOSA, C. M. et al. Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 2, p. 118-126, 2010.

BERTONE, J. J. et al. Clinical field trial to evaluate the efficacy of topically applied diclofenac liposomal cream for the relief of joint lameness in horse. In: **Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 48, 2002, Orlando, United States. **Proceedings...** Orlando: AAEP, 2002. p.190-193.

BURIAN, M. et al. Peripheral and central antihyperalgesic effects of diclofenac in a model of human inflammatory pain. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 74, p. 113-20, 2003.

CALDWELL, F. J. et al. Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 271-276, 2004.

DAY, R. O. Pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 36, n. 3, p. 191-210, 1999.

EMEA. **Diclofenaco**. Agência Europeia para Avaliação de Produtos Médicos - Comitê para Produtos Médicos Veterinários, 2003 – Londres, Inglaterra, 2004. 9p. Capturado em 14 jul. 2009. Online. Disponível na internet: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/088503en.pdf>.

FERRANTE, M. et al. Effect of different penetration enhancers on diclofenac permeation across horse skin. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 3, p. 312-315, 2010.

FLORIO, J. C. Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação. In: SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia aplicada em medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara & Kooogan, 2002. Cap. 4, p. 25-40.

FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 210-215, 2009.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal**, v. 168, p.238-251, 2004.

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – a review. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 51-69, 2006.

HARVEY, W. F.; HUNTER, D. J. The Role of Analgesics and Intra-Articular Injections in Disease Management. **Medical Clinics of North America**, v. 93, p. 201–211, 2009.

HEYNEMAN, C. A. et al. Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. **Drugs**, v. 60, n. 3, p.555-574, 2000.

HOOD, D. M. et al. The role of vascular mechanisms in the development of equine laminitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 228-234, 1993.

KIENZLER, J. L. et al. Systemic bioavailability of topical diclofenac sodium gel 1% versus oral diclofenac sodium in healthy volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 50-61, 2010.

KINCL, M. et al. Characterization of factors affecting the release of low-solubility drug from prolonged release tablets. **Analytica Chimica Acta**, v. 502, p. 107-113, 2003.

LYNN, R. et al. Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. **Veterinary Therapeutics**, v. 5, p. 128–138, 2004.

LOTSCH, J. et al. Population pharmacokinetics of fast release oral diclofenac in healthy volunteers: relation to pharmacodynamics in an experimental pain model. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 1, p. 77-84, 2000.

MAGNUSSON, B. M. et al. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 205–227, 2001.

MANDELL, B. F. General tolerability and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 107, p. 72-76, 1999.

McCORMACK, P. L.; SCOTT, L.J. Diclofenac sodium injection (Dyloject®) in postoperative pain. **Drugs**, v. 68, p. 123-130, 2008.

MILLS, P. C.; CROSS, S. E. Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian. **The Veterinary Journal**. v. 172, p. 218-233, 2006.

MOORE, R. A. et al. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of information from company clinical trial reports. **Arthritis Research and Therapy**, v. 3, p. 644-65, 2005.

NG, V. L. Prothrombin time and partial thromboplastin time assay considerations. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, n. 2, p.253-263, 2009.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: past, present and future. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 285-289, 2009.

PERIS-RIBERA, J. E. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of diclofenac in the rat. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 19, n. 6, p. 647-665, 1991.

RADERMACHER, J. et al. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 31, p. 537-541, 1991.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 58, p. 163-173, 2006.

REILLY, I. A., FITZGERALD, G. A. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. **Blood**, v. 69, p. 180-186, 1987.

RIVIERE J.; PAPICH M. Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 175-203, 2001.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento de gota. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 517-550.

SÁNCHEZ, S. et al. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 12, p. 2791-2798, 2002.

SAVAŞER, A. et al. Preparation and in vitro evaluation of sustained release tablet formulations of diclofenac sodium. **II Farmaco**, v. 60, p. 171-177, 2005.

SCHAFFER, A. I. Effects of nosteroidal anti-inflammatory therapy on platelets. **The American Journal of Medicine**, v. 106, p. 25-36, 1999.

SCHLEINING, J. A. et al. Liposome-based diclofenac for the treatment of inflammation in an acute synovitis model in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, p. 554-561, 2008.

SIMON, L. S. et al. Efficacy and safety of topical diclofenac containing dimethyl sulfoxide (DMSO) compared with those of topical placebo, DMSO vehicle and oral diclofenac for knee osteoarthritis. **Pain**, v. 143, p. 238-245, 2009.

SU, S. F. et al. In vitro and in vivo comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 39-46, 2003.

TASAKA, A. C. Anti-inflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2002, Cap. 21, p. 225-250.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Roca: São Paulo, 2007, 582p.



TORRES-LÓPEZ, J. E. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 685-690, 1997.

VILLA, R. et al. Oral and intravenous administration of nimesulide in the horse: rational dosage regimen from pharmacokinetic and pharmacodynamic data. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 2, p. 136-142, 2007. doi: 10.2746/042516407X159123

VILLARINO, N. F.; LANDONI, M. F. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. **Analecta Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 28-37, 2006.

VILLARINO, N. F. et al. Inefficacy of topical diclofenac in arthritic horses. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.1, p. 8-12, 2006.

WEISS, D. J. et al. Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**. v. 58, n. 12, p. 1376-1380, 1997.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 603-618, 2004.