

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Marina Lopes Castro

**PERFIL FARMACOCINÉTICO DO TRAMADOL E SEU METABÓLITO -O-
DESMETILTRAMADOL EM JIBOIAS (*Boa constrictor constrictor*) EMPREGANDO
A CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA**

Belo Horizonte

2023

Marina Lopes Castro

**PERFIL FARMACOCINÉTICO DO TRAMADOL E SEU METABÓLITO -O-
DESMETILTRAMADOL EM JIBOIAS (*Boa constrictor constrictor*) EMPREGANDO
A CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzane Lilian Beier

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Nogueira Pires de Carvalho

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabíola Paes Leme

Belo Horizonte

2023

C355p Castro, Marina Lopes ,1986-
Perfil farmacocinético do Tramadol e seu metabólito o- Desmetiltramadol em jiboias (*Boa constrictor constrictor*) empregando a cromatografia a líquido com detecção por fluorescência/ Marina Lopes Castro. – 2023.
109f: il

Orientadora: Suzane Lilian Beier

Coorientadores: Marcelo Nogueira Pires de Carvalho
Fabiola Paes Leme

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Inclui Bibliografia

1- Ciência Animal - Teses - 2. Répteis - Doenças - Teses - I. Beier, Suzane Lilian - II. Carvalho, Marcelo Nogueira Pires de – III. Leme, Fabiola Paes - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária –V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARINA LOPES CASTRO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 23 de agosto de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Suzane Lilian Beier - Orientador(a)

Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Dr.(a). Rafael Resende Faleiros

Dr.(a). Anderson Farias

Dr.(a). Fabiola Bono Fukushima

Dr.(a). José Eduardo Gonçalves



Documento assinado eletronicamente por Suzane Lilian Beier, Coordenador(a) de curso, em 24/08/2023, às 21:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rafael Resende Faleiros, Professor do Magistério Superior, em 30/08/2023, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior, em 30/08/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Anderson Farias, Usuário Externo, em 30/08/2023, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Professor do Magistério Superior, em 31/08/2023, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabiola Bono Fukushima, Usuária Externa, em 11/09/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2552214 e o código CRC 5AF02FF9.

Este trabalho é dedicado à todos que me inspiraram ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as inúmeras pessoas que me ajudaram durante toda minha trajetória. Adianto que a ordem dos agradecimentos não é de importância;

Agradeço a Deus que está ao meu lado em todos os momentos, renovando a minha Fé todos os dias;

A minha família, principalmente ao meu amado pai que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Sempre muito atencioso, carinhoso e que não mede esforços para me ajudar;

Agradeço ao Marcos, meu companheiro durante toda a caminhada até aqui, por todo apoio e incentivo;

Agradeço imensamente ao professor Doutor José Eduardo Gonçalves por toda mentoria, paciência e ensinamentos construídos ao longo dessa caminhada;

Agradeço a minha orientadora professora Doutora Suzane Lilian Beier pelo incentivo, colaboração, ensinamentos e pelo acolhimento durante toda a minha jornada como anestesiológica veterinária;

Agradeço aos meus Co-orientadores, prof. Dr. Marcelo Nogueira Pires de Carvalho e Profa. Dra. Fabíola Paes Leme por todas as colaborações e incentivos;

Agradeço a toda equipe do Jiboias Brasil, principalmente a médica veterinária Lara e ao biólogo Nicolas pela grande ajuda e paciência durante a realização do experimento;

Agradeço ao Tiago de Oliveira, representante do Jiboias Brasil, pela oportunidade;

Agradeço ao Cláudio (Tucano) por toda colaboração no meu desenvolvimento profissional;

A todos os que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, participando direta ou indiretamente do desenvolvimento desta pesquisa, enriquecendo meu processo de aprendizagem. especialmente a pós-graduanda Natalya Maldonado e aos alunos da Universidade Federal de Minas Gerais.

A Capes pela concessão pela bolsa de doutorado.

“A forma mais fácil de se transformar é conviver com aqueles que já são quem você quer ser”- Reid Hoffman

RESUMO

O tramadol é um fármaco analgésico de ação mista promissor no controle da dor em répteis, indicado para tratamento de dores leves a moderada. Possui diversos metabólitos, sendo o principal destes o O-desmetiltramadol (M1) por apresentar maior afinidade por receptores μ . As serpentes são consideradas pets não convencionais que estão se tornando mais populares no cotidiano dos médicos veterinários. Por não haver estudos demonstrando a farmacocinética do tramadol em serpentes, assim como a produção e concentração máxima de M1 nestes animais, torna-se necessário pesquisas que iniciem estas avaliações. Este estudo objetivou desenvolver um método analítico cromatográfico para determinação da farmacocinética do tramadol e da quantificação de O-desmetiltramadol (M1) por Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL) em plasma de jiboias, após aplicação do tramadol pelas vias intravenosa (IV) e intramuscular (IM), na dose de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. A farmacocinética do tramadol foi avaliada em jiboias (*Boa constrictor constrictor*) em dose única de $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ pelas vias intravenosa e intramuscular. Dez jiboias saudáveis, macho, em idade reprodutiva, pesando ($4,33 \pm 1,5$ Kg), foram selecionadas. Todos os animais receberam dois tratamentos, com intervalo mínimo de 45 dias: o tratamento 1 (TRIM) continha tramadol $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$, sendo administrado na musculatura epaxial no final do terço inicial da serpente. O tratamento 2 (TRIV) continha tramadol $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$, sendo administrado na veia paravertebral no final do terço cranial da serpente. Foram coletados 15ml de sangue na veia paravertebral para obtenção do plasma, realizados nos momentos: tempo 0 (antes da injeção do tramadol), tempo 1 (20 minutos após injeção do tramadol), tempo 2 (40 minutos após injeção do tramadol), tempo 3 (1 hora após injeção do tramadol), tempo 4 (2 horas após injeção do tramadol), T5 (4 horas após injeção do tramadol), T6 (8 horas após injeção do tramadol), T7 (12 horas após injeção do tramadol), T8 (18 horas após a injeção do tramadol) e T9 (26 horas após injeção do tramadol). A farmacocinética do tramadol foi calculada por um modelo independente. e por meio do software R 4.3.0. O nível de significância considerado para todas as análises foi de 5%. A concentração máxima de TRIM e TRIV foi de 2,58 e 3,39, respectivamente. A meia vida de eliminação foi de $19,96 \pm 8,34$ horas para TRIM e $17,32 \pm 7,55$ horas para TRIV. A biodisponibilidade do tramadol por via IM foi de 61% com meia via de eliminação longa independente da via de administração. O M1 obteve concentração máxima de 0,58 para TRIM e 0,59 para TRIV. A

meia vida de eliminação do M1 foi de aproximadamente $49,89 \pm 10,8$ horas no TRIM e $35,66 \pm 10,85$ horas para TRIV. O tramadol é rapidamente biotransformado em M1, resultando em altas concentrações por período prolongado. A administração de tramadol por via IM pode ser uma boa alternativa visto que houve equivalência estatística de M1 entre as vias. Não foram observados efeitos adversos com a administração de tramadol no presente estudo.

Palavras-chave: dor, répteis, analgesia, opioides

ABSTRACT

Tramadol is a promising mixed-action analgesic drug for pain control in reptiles, recommended for the treatment of mild to moderate pain. It has various metabolites, with O-desmethyltramadol (M1) being the primary one due to its higher affinity for μ receptors.

Snakes are considered unconventional pets that are becoming increasingly popular in the daily routines of veterinarians. Since there are no studies demonstrating the pharmacokinetics of tramadol in snakes, as well as the production and peak concentration of M1 in these animals, it's necessary to initiate research on these evaluations. This study aimed to develop an analytical chromatographic method to determine the pharmacokinetics of tramadol and quantify O-desmethyltramadol (M1) using High-Performance Liquid Chromatography with a fluorescence detector (HPLC-FL) in the plasma of boas after administering tramadol intravenously (IV) and intramuscularly (IM) at a dose of $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The pharmacokinetics of tramadol were evaluated in boas (*Boa constrictor constrictor*) in a single dose of $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ administered both intravenously and intramuscularly. Ten healthy male boas, of reproductive age, weighing (4.33 ± 1.5 Kg), were selected. All animals received two treatments, with a minimum interval of 45 days: treatment 1 (TRIM) contained tramadol $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, administered in the epaxial muscle at the end of the snake's initial third. Treatment 2 (TRIV) contained tramadol $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, administered in the paravertebral vein at the end of the snake's initial third. 15 mL of blood was collected from the paravertebral vein to obtain plasma, taken at the following times: time 0 (before tramadol injection), time 1 (20 minutes after tramadol injection), time 2 (40 minutes after tramadol injection), time 3 (1 hour after tramadol injection), time 4 (2 hours after tramadol injection), T5 (4 hours after tramadol injection), T6 (8 hours after tramadol injection), T7 (12 hours after tramadol injection), T8 (18 hours after tramadol injection), and T9 (26 hours after tramadol injection). The pharmacokinetics of tramadol were calculated using an independent model and through the R 4.3.0 software. The significance level considered for all analyses was 5%. The peak concentration of TRIM and TRIV was 2.58 and 3.39, respectively. The elimination half-life was 19.96 ± 8.34 hours for TRIM and 17.32 ± 7.55 hours for TRIV. The bioavailability of tramadol via IM was 61%, with a long elimination half-life regardless of the administration route. M1 had a peak concentration of 0.58 for TRIM and 0.59 for TRIV. The elimination half-life of M1 was approximately 49.89 ± 10.8 hours for TRIM and 35.66 ± 10.85

hours for TRIV. Tramadol is rapidly biotransformed into M1, resulting in high concentrations over an extended period. Administering tramadol via IM might be a good alternative since there was statistical equivalence of M1 between the routes. No adverse effects from tramadol administration were observed in this study.

Keywords: pain, reptiles, analgesia, opioids.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Equações utilizadas para análise farmacocinética (adaptado de Shargel e Yu., 2012).	94
----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A- Cromatograma da injeção de fase móvel (tampão:acetonitrila) no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296); B- Cromatograma da injeção de fase móvel, pH 2,9 (tampão:acetonitrila) no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365).	75
Figura 2	Cromatograma de amostra extraída de plasma branco de jiboias no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) (A) e no comprimento de onda da ondansetrona (B) (Ex. 305; Em. 365).	75
Figura 3	Cromatograma de amostra extraída de plasma hemolisado branco no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296)(A) e no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365) (B).	76
Figura 4	Cromatograma da injeção da solução de tramadol e de M1 na concentração C1 da curva, no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) (A). Cromatograma da injeção da solução de ondansetrona na concentração C1 da curva, no comprimento de onda da Ondansetrona (Ex. 305; Em. 365) (B).	76
Figura 5	Cromatograma da injeção da solução de tramadol e de M1 na concentração C6 da curva, no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).	77
Figura 6	Curva analítica média e parâmetros referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de tramadol em plasma de jiboias proveniente do desenvolvimento de método empregando-se a técnica CLAE-FL. Cada ponto representa a média de três determinações.	78
Figura 7	Curva analítica média e parâmetros referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de M1 em plasma de jiboias proveniente do desenvolvimento de método empregando-se a técnica CLAE-FL. Cada ponto representa a média de três determinações.	78
Figura 8	Cromatogramas sobrepostos são representativos das injeções da extração de plasma de jiboia enriquecidos com padrão de tramadol e M1 em todas as concentrações na curva de calibração para avaliação da linearidade do método no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).	78
Figura 9	A- Cromatogramas de amostras extraídas do plasma de jiboias no T0 no comprimento de onda da tramadol (Ex. 202; Em. 296). B- Cromatogramas de amostras de plasma de jiboias no T0 no comprimento de onda ondansetrona.	82
Figura 10	Cromatogramas de amostras extraídas de plasma de jiboias no T2 pela via IV no comprimento de onda da tramadol (Ex. 202; Em. 296).	83
Figura 11	Cromatogramas de amostra extraída de plasma de jiboias no T5 pela via IM no (A) comprimento de onda do tramadol ((Ex. 202; Em. 296) e (B) no comprimento de onda da ondansetrona ((Ex. 305; Em. 365).	83
Figura 12	Cromatogramas de amostras de plasma de jiboias no T9 pela via IM no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).	84
Figura 13	Perfil médio de concentração plasmática de tramadol <i>versus</i> tempo ao longo do experimento para a administração intravenosa e intramuscular de tramadol na dose de 5mg.kg ⁻¹	95
Figura 14	Perfil médio de concentração plasmática de M1 <i>versus</i> tempo ao longo do experimento para a administração intravenosa e intramuscular de tramadol na dose de 5mg.kg ⁻¹	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dose, concentração máxima (C _{max}) e meia vida (t _{1/2}) do tramadol em diferentes espécies	34
Tabela 2	Dose, concentração máxima (C _{max}) e meia vida (t _{1/2}) de M1 em diferentes espécies	35
Tabela 3	Parâmetros farmacocinéticos para o tramadol e O-desmetiltramadol em outras espécies de animais (adaptado de Kimble et al., 2021).	38
Tabela 4	Procedimento experimental, coleta de sangue e observações	65
Tabela 5	Soluções diluídas para construção de soluções trabalho dos analitos	67
Tabela 6	Condições cromatográficas do método analítico por CLAE-FL	68
Tabela 7	Soluções diluídas para construção de curva de calibração de tramadol	69
Tabela 8	Soluções diluídas para construção de curva de calibração do M1	70
Tabela 9	Resumo final das condições cromatográficas do método analítico para determinação de Tramadol e metabólito do metabólito M1 (O-desmetiltramadol) em plasma de jiboias por CLAE-FL	74
Tabela 10	Precisão e exatidão calculadas a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos(inter-dia) para o tramadol utilizando CLAE-FL.	79
Tabela 11	Precisão e exatidão calculadas a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos(inter-dia) para o M1 utilizando CLAE-FL.	79
Tabela 12	Estabilidade de curta duração do tramadol em fase móvel após 8 horas em temperatura ambiente (t°ambiente). Resultados apresentam a média de seis determinações.	80
Tabela 13	Estabilidade de curta duração do M1 em fase móvel após 8 horas em temperatura ambiente (t°ambiente). Resultados apresentam a média de seis determinações	81
Tabela 14	Estabilidade do tramadol no plasma após 24 horas de congelamento a -20 °C. Resultados apresentam a média de seis determinações	81
Tabela 15	Estabilidade do M1 no plasma após 24 horas de congelamento a -20 °C. Resultados apresentam a média de seis determinações	81
Tabela 16	Parâmetros farmacocinéticos do tramadol, média ± desvio padrão, na dose 5mg.kg ⁻¹ após administração por via intravenosa e intramuscular em jiboias	96
Tabela 17	Parâmetros farmacocinéticos do M1, média ± desvio padrão, na dose 5mg.kg ⁻¹ após administração de tramadol por via intravenosa e intramuscular em jiboias	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivos gerais.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	Répteis e a família Boidae.....	20
3.2	Fisiologia da dor.....	22
3.3	Reconhecimento da dor em répteis	27
3.4	Utilização de opioides em répteis.....	28
3.5	Tramadol e O-desmetiltramadol (M1)	30
3.6	Princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e validação de método analítico.....	38
3.7	Parâmetros de validação do método.....	43
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TRAMADOL E DO METABÓLITO O-DESMETILTRAMADOL EM PLASMA DE JIBOIAS	60
1	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1	Infraestrutura	62
2.2	Animais	62
2.3	Delineamento experimental.....	64
3	RESULTADOS	73
3.1	Animais	73
3.2	Condições cromatográficas	73
3.3	Seletividade	74
3.4	Linearidade.....	77
3.5	Precisão e exatidão	79
3.6	Limite de Detecção e Quantificação	79
3.7	Estabilidade dos analitos	80
3.8	Análise da extração	82

4	DISCUSSÃO.....	84
5	CONCLUSÃO	87
CAPÍTULO II. FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL EM PLASMA DE JIBOIAS: DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA DO TRAMADOL E O SEU METABÓLITO O-DESMETILTRAMADOL PELA VIA INTRAMUSCULAR.....		
1	INTRODUÇÃO	90
2	MATERIAL E MÉTODO.....	91
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	94
4	RESULTADOS.....	95
5	CONCLUSÃO	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		106

1 INTRODUÇÃO GERAL

A dor é considerada o quinto sinal vital sendo definida pela Associação internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiencial emocional ou sensorial desagradável, expressa pelo indivíduo, que pode ou não estar associada com danos teciduais ou nervosos, sendo primeiramente uma resposta fisiológica, alertando o organismo de um potencial dano (Hellebrekers, 2002).

Em situações que causem algia, a dor deve ser adequadamente tratada já que promove inúmeras alterações deletérias à homeostase (Muir, 2008; Sladky e Mans, 2012; Perry e Nevarrez, 2018).

Em entrevista realizada por Read (2004) 98% dos veterinários entrevistados que atenderam répteis, afirmaram que os répteis eram capazes de experimentar a dor, porém o fornecimento de analgesia era pouco comum. As razões incluíam o não reconhecimento da dor, a falta de dados da eficácia dos fármacos utilizados, preocupação com os efeitos adversos, pouca ou nenhuma informação sobre a dosagem do fármaco e nenhuma informação farmacocinética determinada experimentalmente para a espécie. Mais de 75% dos veterinários de répteis neste inquérito consideraram que o seu reconhecimento da dor nestes animais era inadequado.

Grandes avanços foram alcançados no reconhecimento e tratamento da dor em animais de companhia, como em cães e em gatos, em que escalas multidimensionais foram validadas para nortear a identificação da dor e posterior tratamento. Em répteis, essa área é insipiente devido as características inerentes da classe, como por exemplo a ausência de expressão facial, a ausência de vocalização de alto ruído e reações exacerbadas frente a um estímulo doloroso, tais características refletem dificuldade para a validação dos sinais característicos de dor, não existindo ainda escalas validadas (Ayers, 2016; Serinelli et al., 2022).

As controvérsias sobre a capacidade dos répteis em sentirem dor são inaceitáveis já que possuem estruturas neuroanatômicas homólogas aos dos mamíferos como nociceptores, via neural ascendente e descendente e um córtex cerebral. Portanto, eles devem ser tratados com analgésicos em situações consideradas dolorosas, evitando qualquer tipo de sofrimento (Sladky e Mans, 2012; Garcia et al., 2015; Perry e Nevarez, 2018).

Serpentes do gênero *Boa* são comercializadas e criadas como pets não convencionais, sendo consideradas mundialmente, dentre as serpentes, as mais belas e dóceis. Com isso, estes animais estão atualmente mais presentes na rotina clínica dos veterinários, sendo fundamental o médico veterinário conseguir prover o tratamento mais adequado, garantindo sempre o bem-estar animal (Garcia et al., 2015; Lima et al., 2019; Dervas et al., 2023).

O tramadol, agonista de receptores μ , é um fármaco opioide atípico, com ação mista analgésica decorrente da ativação central dos mecanismos inibitórios da dor, considerado promissor para promover analgesia em répteis. Este fármaco é biotransformado no fígado, o que produz o metabolito ativo denominado O- desmetiltramadol (M1), que garante o efeito analgésico mais pronunciado, em muitas espécies. Alguns estudos demonstraram que o tramadol é um fármaco seguro e que garantiu analgesia em espécies de tigres d'água como *Trachemys scripta* (Baker et al., 2011; Giorgi et al., 2015).

Embora as informações farmacocinéticas sejam úteis, como um guia preliminar para determinar doses e intervalos adequados, elas não são suficientes para estabelecer a efetividade do fármaco, pois as concentrações plasmáticas não são sempre relacionadas a analgesia (Hawkins, 2006), sendo assim, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são necessários.

Em serpentes, não existem estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos com o tramadol, sendo assim, pesquisas correlacionando a concentração do fármaco no sangue que atinge o Sistema Nervoso Central (SNC) causando efeito analgésico, tornam-se imprescindíveis (Souza e Cox, 2011). A partir disso, começaremos a desenvolver estudos farmacodinâmicos, traçar evidências sobre a analgesia em répteis e elucidar o tratamento da dor em serpentes.

O método bioanalítico mais recomendado para avaliar quantitativamente um fármaco numa matriz biológica é a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Nela pequenas quantidades de um fármaco podem ser detectadas, sendo o detector de fluorescência (FL) bastante utilizado quando o fármaco tem capacidade fluorescente (Ribani, 2004; Giorgi et al., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo determinar a farmacocinética do tramadol e quantificar seu metabólito M1 em plasma de jiboias (*Boa constrictor constrictor*) após administração de 5mg.kg^{-1} por via intravascular (IV) e intramuscular (IM) utilizando a técnica de CLAE-FL. Foi desenvolvido um método analítico, capaz de detectar as concentrações dos fármacos no plasma, sendo correlacionadas de forma indireta, com as concentrações que exercem analgesia em outras espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL) para determinação de tramadol e do metabólito O-desmetiltramadol (M1) em plasma de jiboias após aplicação do tramadol pelas vias intravenosa (IV) e intramuscular (IM), na dose de 5mg.kg^{-1} .

2.2 Objetivos específicos

- Definir a matriz de estudo;
- Avaliar os métodos de extração;
- Otimizar o método cromatográfico envolvendo seleção do PI, da coluna, fase móvel e do comprimento de onda de detecção;
- Avaliar a performance do método por meio dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade em curto prazo;
- Validar o método analítico demonstrando que é específico para o tramadol e para o M1, e estes não são afetados por outros componentes do plasma;
- Determinar o perfil farmacocinético do tramadol por via intramuscular na dose de 5mg.kg^{-1} em jiboias;
- Estudar a biodisponibilidade do tramadol por via intramuscular na dose de 5mg.kg^{-1} em jiboias.

- Quantificar o metabólito M1, determinar a meia vida de eliminação e tempo residual médio;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Répteis e a família Boidae

Os répteis compreendem uma classe que apresenta diferenças filogenéticas significativas entre as espécies, com três Ordens de maior relevância: Squamata, Testudine e Crocodilia. Esta classe de animais apresenta componentes neurológicos similares àqueles encontrados em aves e mamíferos, comprovando que possuem estruturas semelhantes para detecção da dor e comportamentos associados a esta. Além disso, os neurotransmissores envolvidos na modulação nociceptiva em mamíferos também têm sido identificados em répteis (Bennett 1998; Sladky e Mans 2012).

Os reptéis são animais ectotermicos por isso, dependem de fontes externas de calor, para manter a temperatura corporal interna. E a taxa metabólica é regulada pela capacidade de termorregulação, que exerce alta influência na absorção, metabolismo e na eliminação de fármacos, sendo indicado sempre mantê-los em faixa de temperatura ótima para espécie de 25 a 35°, em espécies tropicais (Eatwell, 2010; Shine, 2013; O'Malley, 2017).

A família Boidae é composta por cinco gêneros neotropicais encontradas desde o norte do México até o sul da América do Sul, são eles os gêneros Eunectes, Boa, Corallus, Epicrates e Chilabothrus (Pyron et al., 2014).

Ainda, existem muitas dúvidas com relação à evolução das serpentes, mas a família Boidae é considerada bastante primitiva datando do período Cretáceo. Animais dessa família apresentam osso coronoide, que faz parte da anatomia da mandíbula, dois pulmões funcionais, um par de esporões vestigiais, duas artérias carótidas e são vivíparas. De forma geral, a família apresenta o corpo cilíndrico, são animais de médio a grande porte. Sendo que esta família possui espécies liberadas para comercialização como animais pets no Brasil (Eatwell, 2010; Monroy-Vilchis et al., 2011; Shine, 2013; O'Malley, 2017; Dervas et al., 2023).

O gênero Boa, atualmente é composto por duas espécies, a Boa constrictor e a Boa imperador e nove subespécies, que diferem entre si em inúmeras características, como tamanho do corpo,

distribuição dos padrões de manchas e desenhos na pele, coloração, comportamento, dieta, dentre outras características (Boback e Lynn 2010; Uetz e Hosek 2020; Viana, 2020).

Os terços corporais são usados para descrever e organizar as estruturas anatômica das serpentes, sendo o terço cranial compreendendo coração, traqueia, esôfago, tireoide e pulmão proximal; o terço médio é composto pelo estômago, fígado, pulmão distal, baço e pâncreas; e o terço caudal pelos intestinos delgado e grosso, rins e gônadas. Morfologicamente, apresentam corpos lineares, assimetria de órgãos celomáticos, sendo para órgãos pares, os presentes do lado direito mais desenvolvidos e mais craniais em relação ao lado oposto (O'Malley, 2017; Lima et al., 2019).

Estes animais possuem o sistema portal-renal, o que significa que uma parte ou a totalidade do sangue venoso da parte caudal do corpo deve passar pelo fígado e pelos rins antes de chegar ao coração. A veia porta cranial, um ramo da veia isquiática externa, e a veia porta caudal, que recebe sangue venoso de membros, cauda, pelve, parte caudal do intestino e da coluna vertebral, formam um plexo venoso localizado ventralmente ao rim, que pode afetar a eficácia de fármacos, através de mecanismo de primeira passagem, que é o metabolismo ou excreção antes de desencadear o efeito clínico. A importância clínica ainda não foi descoberta, sendo que a maioria dos estudos de fluxo sanguíneo porta renal em répteis foi realizado em tartarugas, em que houve demonstração de tal efeito, apesar de controverso. Mas, atualmente, ainda é recomendado evitar administrações de fármacos na porção caudal do corpo destes animais (Holz et al., 2002; Slady e Mans, 2012; Giorgi et al., 2015; Norton et al., 2015).

Os répteis não possuem um diafragma muscular separando as cavidades torácica e abdominal. As serpentes usam uma combinação de músculos lisos nas paredes pulmonares, bem como músculos intercostais para respiração. Fisiologicamente, os répteis têm uma taxa metabólica de 12 a 20 vezes mais baixa do que aves e mamíferos de mesmo tamanho, taxa de respiração mais lenta e uma taxa de consumo de oxigênio menor do que os mamíferos (Nagy, 2005). A respiração em répteis é controlada pelas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono no sangue, bem como pelas temperaturas ambientais (Slady e Mans, 2012).

O exame físico pode indicar o estado de higidez das serpentes, ele deve ser conduzido inicialmente observando-se o comportamento, a postura e a movimentação do animal, na direção craniocaudal, incluindo inspeção da cavidade oral, dos orifícios nasais e da membrana ocular, palpando-se todo o corpo dos animais e finalizando com uma inspeção da cloaca. A pele e a superfície interior das escamas que recobre todo o corpo sempre devem ser examinadas, atentando-se para a presença de parasitos e lesões (Hiinarejos et al., 2007).

3.2 Fisiologia da dor

Somente em 1986, a Associação internacional para o Estudo da Dor (IASP) conseguiu definir a dor como sendo uma experiência sensorial e emocional desagradável, expressa pelo indivíduo, representando uma lesão real ou potencial, sendo composta não só pela nocicepção, mas também pela dimensão emocional (Hellebrekers, 2002).

Os componentes do Sistema Nervoso Central (SNC) associados à percepção e ao processamento da dor em répteis são homólogos aos dos mamíferos. Em répteis, o Sistema Nervoso (SN) é composto pelo cérebro, que corresponde a 1% da massa corporal, e pela medula espinhal, que se prolonga até a cauda, porém não possuem cauda equina (Bennett, 1996). Foram detectados em répteis, o pálido dorsal, que evolutivamente deu origem ao córtex cerebral dos mamíferos, sendo que o córtex dos hemisférios cerebrais é bastante simples e rudimentar, com apenas uma camada de células, enquanto os mamíferos apresentam seis camadas de isocórtex (Dalgarrondo, 2011; Perry e Nevarez, 2018).

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma estrutura que protege o cérebro de substâncias potencialmente prejudiciais presentes na corrente sanguínea. Ela é formada por células especializadas (pericitos, células gliais e lâmina basal) que revestem os vasos sanguíneos no cérebro e no sistema nervoso central (SNC), regulando o fluxo de moléculas entre o sangue e o tecido cerebral. Nos répteis, pouco se sabe sobre a BHE, tanto em sua estrutura quanto em sua heterogeneidade entre diferentes táxons de répteis. Alguns estudos demonstraram que o endotélio cerebral em espécies como o lagarto *Anolis carolinensis* é semelhante ao dos mamíferos, no que diz respeito a junções intercelulares muito estreitas, além de ser funcional e

desempenhar um papel crucial na proteção do cérebro, sendo impermeável a muitas substâncias (Dunton et al., 2021).

Os répteis têm características anatômicas necessárias para sentir ou experimentar emoções. Os mecanismos referentes à transmissão de sinais sensoriais periféricos e as respostas de fuga a estímulos nocivos também são homólogos em muitas espécies, possuindo nociceptores periféricos apesar dos mecanismos de percepção da dor serem diferentes e variar entre os representantes (Bennett 1998; Partata, 2003; Eatwell, 2011; Sladky e Mans, 2012; Darrow et al., 2016).

A ativação da dor desencadeia maior atividade do sistema nervoso autônomo simpático, o qual é responsável pela liberação de catecolaminas, as quais atuam no coração, aumentando o esforço cardíaco e a demanda de oxigênio. Há aumento da frequência respiratória, diminuição da motilidade gastrointestinal e ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona, que desencadeia aumento de sódio e retenção de água. Além disso, ocorre o aumento da produção de cortisol que prejudica as funções imunológicas e cicatriciais. Sendo assim, o não reconhecimento da dor, e conseqüentemente, o não tratamento desta desencadeará prejuízo na homeostase, promovendo alterações na fisiologia que prejudicarão o bem-estar animal, aumentando a morbidade e a mortalidade (Sladky e Mans, 2012; Posner e Chinnadurai, 2014).

Em serpentes, estudos que comprovam a presença da dor ou a analgesia estão em desenvolvimento (Darrow et al., 2016). Por esta razão, a analgesia é muitas vezes negligenciada e pode ser difícil quantificá-la clinicamente. Alguns estudos para reconhecimento da dor já foram realizados, principalmente na ordem Testudine, em que foram identificados receptores opioides, porém as respostas aos opiáceos variam em relação aos mamíferos (Baker et al., 2011; Eatwell, 2011; Norton et al., 2015; Giorgi et al., 2015; Doss et al., 2021). Entretanto, segundo Kharbush et al. (2017) em serpentes parece que a sinalização do receptor opioide é diferente, e ainda, não existem estudos que evidenciem a eficácia analgésica para qualquer fármaco do grupo.

A detecção dos estímulos nociceptivos que podem ser dolorosos ou inofensivos é realizada pelos nociceptores que são responsáveis pela transdução do estímulo em sinais elétricos chamados de potenciais de ação. Após a transdução, a informação é transmitida por receptores, fibras e neurônios especializados até o corno dorsal da medula espinhal onde a informação elétrica será modulada, projetada e percebida no cérebro (Lamont, 2008; Muir, 2008).

As fibras aferentes primárias que transmitem os sinais elétricos periféricos para o SNC são divididas de acordo com a velocidade de condução do impulso nervoso, e conseqüentemente pelo calibre dos axônios e mielinização. As principais fibras envolvidas são: as C, as A- δ , as A- β e as A- α (Muir, 2008; Matthews et al., 2015).

As fibras C, não são mielinizadas, são ativadas por estímulos mecânicos, químicos e térmicos intensos, ou seja, de alto limiar e que contribuem para a sensação de dor do tipo lenta. Já as fibras A- δ , mielinizadas, conduzem impulsos mais rapidamente, e contribuem para a resposta rápida à dor aguda, que resulta num afastamento imediato do estímulo doloroso. As fibras A- β transmitem informações relacionadas a estímulos inofensivos, como tato, vibração e pressão, e, podem sofrer neuroplasticidade e levar a hiperalgesia (Muir, 2008; Matthews, et al., 2015).

Na medula espinhal ocorrem interações complexas entre variados estímulos neurais aferentes e diferentes tipos de transmissões que resultam num equilíbrio sensorial entre sinais excitatórios e inibitórios descendentes do cérebro, chamado de modulação. Os principais neuromoduladores inibitórios da transmissão excitatória são o ácido gama aminobutírico (GABA), os opioides endógenos e a serotonina. Já os principais neuromoduladores facilitadores da transmissão excitatória são a substância P e os prostanoídes (Muir, 2008).

O trato espinotalâmico, que se origina na medula cinzenta no corno dorsal da medula espinhal, é a via nociceptiva ascendente que transmite as informações nociceptivas até o cérebro onde ela será percebida. O sistema ativador reticular (SAR), localizado no tronco cerebral, filtra as informações sensoriais e medeia as respostas motoras, autônomas e endócrinas antes de passar ao tálamo. O tálamo, estrutura localizada no diencéfalo, integra e retransmite as informações sensoriais para a percepção da dor e respostas motoras a ela (Muir, 2008).

Em seres humanos e nos mamíferos os processos biológicos e as modificações genéticas são similares em resposta a estímulos dolorosos, e sabe-se que esses eventos estabelecem a memória de dor (Muir, 2008; Sladky & Mans, 2012; Mendel, 2014). Nesse sentido, terapias que previnem a sensibilização central e as alterações neuroplásticas devem ser instituídas preventivamente. O tratamento da dor pode ser realizado em cada uma das etapas: transdução, transmissão, modulação, projeção e percepção, porém é necessária familiarizar-se com os comportamentos que indicam desconforto e dor para melhor aplicação da terapêutica e através da escala desenvolvida pela Organização Mundial da Saúde enquadrar o processo algico quanto ao nível de dor, que pode ser leve, moderada, intensa ou refratária a farmacoterapia e duração desta (Portenoy, 2010; Mckune et al., 2017; Olsson e Simpson 2017; Ting et al., 2022).

Para garantir a qualidade de vida e o bem-estar do paciente, aqueles que são acometidos por comorbidades que sabidamente causam dor ou que clinicamente apresentam fraturas, feridas ou queimaduras é necessário que a analgesia seja instituída em primeiro lugar. Em répteis e principalmente em serpentes, por exemplo, algumas enfermidades como as neoplasias ovarianas, cálculos cloacais, estenose do oviduto, constipação e prolapso de hemipênis estão entre as principais causas de encaminhamento a centros cirúrgicos, sendo necessário o alívio da dor, da inflamação e do desconforto (Pliego et al., 2007; Di Girolamo e Mans, 2016; Lima et al., 2019).

Existem muitas maneiras de classificar a dor, mas de forma simplificada, a dor pode ser classificada quanto a duração como dor aguda e dor crônica, sendo a dor crônica classificada como de origem oncológica ou não oncológica; e de acordo com o tempo relativo ao início da dor, porém, a distinção entre as duas não é clara em todos os casos (Portenoy et al., 2010; Mckune et al., 2017).

A dor aguda, pode ser correlacionada ao mecanismo fisiopatológico sendo classificada em dor nociceptiva. Neste caso, a dor possui uma duração previsível, sendo autolimitada e facilmente diagnosticada, terminando quando a cicatrização da lesão está completa e apresenta um propósito biológico de função protetora, anunciando a presença de um estímulo potencialmente nocivo. Esta situação, pode ser exemplificada pela dor pós-operatória (Portenoy et al., 2010;

Carvalho e Parsons, 2012). A transição entre a dor aguda para a dor crônica é variada, e considera-se crônica quando persiste além do tempo normal de cicatrização, associada a inflamações e alterações persistentes no sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC) (Portenoy et al., 2010; Mckune et al., 2017).

A dor pode ser ainda classificada quanto a outros mecanismos fisiopatológicos em inflamatória ou patológica (neuropática ou disfuncional) (Woof, 2010; Matthews et al., 2015; Mckune et al., 2017).

A dor inflamatória, após lesão tecidual, dá origem a um processo inflamatório através da ativação celular e liberação de mediadores como a bradicinina, histamina, prostanoídes, leucotrienos e citocinas que ativam ou sensibilizam os neurônios nociceptivos periféricos através da diminuição do limiar nociceptivo (Portenoy et al., 2010; Woof, 2010; Matthews et al., 2015; Mckune et al., 2017).

A dor patológica, decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, pode ser subdividida em dor neuropática e disfuncional. A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central (trato espinotalâmico) ou periférico. Já a dor disfuncional, não tem uma causa evidente, não sendo identificado estímulo, processo inflamatório ou lesão no sistema nervoso, sendo a possível causa uma disfunção bioquímica com liberação de neurotransmissores (Portenoy et al., 2010; Woof, 2010; Matthews et al., 2015; Mckune et al., 2017).

Quando a nocicepção não é inibida, pode ocorrer sensibilização periférica e, em seguida, sensibilização central pela magnificação dos estímulos dolorosos, o que amplifica e prolonga a resposta a dor e aumenta a excitabilidade e as descargas ectópicas espontâneas. Em situações de dores crônicas, observadas em neuropatias e em pacientes oncológicos, sabe-se que fibras A- β sofrem plasticidade. Isto resulta em um potencial de ação reduzido e uma prolongada duração do estímulo, fatores associados à hiperalgesia. As terminações periféricas do corpo da fibra A- β aumentam a expressão de receptores que são sensíveis a estímulos dolorosos, como receptores de substância P. Com isso, a percepção da dor é aumentada e contribui para o

desenvolvimento de síndromes dolorosas crônicas. Assim, o controle da dor deve ser realizado de forma eficiente, evitando a sensibilização do SNC, atenuando a resposta simpática e reduzindo os níveis de dor (Fantoni e Mastrocinque, 2012; Mendell, 2014).

3.3 Reconhecimento da dor em répteis

Reconhecer a dor em répteis é ainda um desafio para a medicina veterinária. Embora este tema ainda necessite de amplas pesquisas científicas, é inaceitável não tratar a dor em animais que possam experimentá-la (Ayers, 2016; Doss et al., 2021; Serinelli et al., 2022).

A dor é uma experiência complexa e multidimensional, em que não existe um único parâmetro patognomônico para a sua identificação, entretanto o reconhecimento é o primeiro passo para a instituição de medidas analgésicas (Ayers, 2016; Doss et al., 2021; Serinelli et al., 2022).

Em pets não convencionais, como os répteis, escalas multidimensionais validadas para avaliação de dor ainda não existem devido a inúmeros fatores, como a falta de consenso entre os especialistas sobre o reconhecimento da dor no SNC e sobre o comportamento relacionado à dor nesses animais. Além disso, a ausência de expressão facial e vocalização, tão presentes em mamíferos, torna ainda mais difícil a compreensão da dor em répteis (Ayers, 2016; Serinelli et al., 2022).

Ayers (2016) realizou uma pesquisa para unir informações a respeito do reconhecimento da dor e tratamento desta em répteis, sendo respondida por cuidadores e médicos veterinários familiarizados com estes pets. Uma lista de comportamentos relacionados à dor foi publicada em serpentes, lagartos e testudines. No questionário, a dor intensa foi determinada quando havia lesões por esmagamento e queimaduras extensas. Dor moderada foi associada a doenças crônicas e dor leve foi associado a manipulação após a refeição. Para serpentes, os três principais sinais de dor, segundo os veterinários da pesquisa eram postura corporal incomum, aumento da agressividade e caquexia.

Atualmente, já é consenso que os répteis sofrem modificações no comportamento, no nível de atividade e na ingestão de alimentos quando estão em sofrimento. Apesar dessas mudanças

serem muito inespecíficas, fazem parte de uma abordagem multidimensional para avaliar a dor nessa classe animal (Ayers, 2016; Doss et al., 2021; Serinelli et al., 2022). Levando-se em consideração a medicina baseada em evidências, os sinais clínicos de dor em répteis podem ser associados a postura curvada, baixa ingestão de alimentos, modificação no comportamento ou interatividade, contrações musculares ou não, descoloração ou escurecimento da pele, olhos opacos, aerofagia e diminuição da tendência de se enrodilhar (para serpentes). Por isso deve ser preconizado a analgesia preemptiva e uma abordagem de tratamento multimodal para a dor (Eatwell, 2010; Mosley, 2011; Goldberg, 2017 Perry e Nevarez 2018; Doss et al., 2021).

Existem vários sinais gerais que podem indicar problemas no bem-estar, entre eles a presença de doença, desnutrição, desidratação, crescimento lento, desequilíbrios hormonais, ausência de reprodução. O estresse também pode afetar negativamente o bem-estar animal, reduzindo as defesas imunológicas e comprometer a cura, o que pode levar à chamada síndrome da má adaptação. Além disso, alguns animais podem excretar urinas e fezes quando em situações de estresse (Hedley et al., 2018).

Nas serpentes, a Síndrome Geral da Má Adaptação, descrita por Selye em 1936, pode ter início a partir de alguns estímulos nocivos do ambiente que desencadeia uma incapacidade do sistema nervoso de gerar uma resposta eficiente, podendo levar à depressão dos sistemas e à morte. Nessa situação, observa-se imobilidade comportamental e bradicardia também chamada de síncope vagal (Grego, 2006).

A alteração de parâmetros fisiológicos, como a frequência cardíaca e respiratória, pode ser um sinal de que o animal está sofrendo e pode estar em angústia, portanto é importante não só atentar ao comportamento animal, mas conduzi-lo ao veterinário assim que notar alguma mudança na rotina comportamental do réptil (Hiinarejos et al., 2007; Hedley et al., 2018).

3.4 Utilização de opioides em répteis

Ao longo dos anos, o conceito de opioide evoluiu para incluir todas as substâncias naturais ou sintéticas que apresentem, em grau variado, propriedades semelhantes à morfina e que atuam em, ao menos três diferentes receptores opioides espalhados no SNC e em diversas partes do

organismo. Este é o principal grupo farmacológico capaz de garantir analgesia em uma vasta variedade de espécies, inclusive em répteis, apesar de existirem poucos estudos na classe reptiliana (Duarte, 2005; Sladky e Mans, 2012).

Os três receptores pertencentes ao sistema opioides são: μ , δ , κ que integram uma superfamília de receptores acoplados à proteína G1. Os receptores opioides estão distribuídos tanto no SNC como no SNP, no coração, fígado, pulmões, trato gastrointestinal e sistema reprodutor (Waldhoer et al., 2004; Duarte, 2005; Le Merrer et al., 2009;).

Os opioides atuam na inibição da transdução do estímulo nocivo e na modulação da dor, minimizando ou impedindo a sua percepção. Os opioides atuam promovendo a abertura dos canais de potássio controlados por voltagem, desencadeando hiperpolarização da membrana e redução da excitabilidade neuronal. Além disso, ocorre redução da liberação de neurotransmissores excitatórios pela inibição do influxo de cálcio (Xia e Haddad, 2001; Waldhoer et al., 2004; Duarte, 2005; Le Merrer et al., 2009).

Os opioides agonistas totais promovem maior analgesia em relação a outras classificações de opioides. E os efeitos desta classe, em muitas espécies de répteis, ainda são desconhecidos. A literatura relata que existem variações quanto à duração, na potência e nos efeitos colaterais, que podem estar presentes principalmente quando se utiliza doses por extrapolação alométrica, a partir de doses usadas em mamíferos ou até mesmo interespecies (Xia e Haddad, 2001; Somogyi et al., 2007; Mosley, 2011; Sladky e Mans 2012; Ayers, 2016).

A ativação de receptores μ está relacionados a sinais como euforia, sedação, analgesia, depressão respiratória, miose, inibição da motilidade gástrica, dependência e liberação de hormônio antidiurético. A dosagem correta dos fármacos deve assegurar o controle da dor sem a ocorrência de efeitos adversos (Somogyi et al., 2007).

Os opioides são bases fracas no qual em meio básico sua forma não ionizada proporciona elevada absorção (Kerrigan e Goldberger, 2003). A maioria dos opioides são biotransformados no fígado através de reações de fase I (modificação) e fase II (conjugação) e posteriormente são eliminados por via renal (Somogyi et al., 2007; Lamont, 2008; Portenoy et al., 2010).

Agonistas de receptor μ puros, estão proporcionando maior sucesso em serpentes. No geral, recomenda-se a utilização dos opioides μ puros, mas o regime de intervalo é empírico. Em relação ao butorfanol e a buprenorfina evidências sugerem que sejam analgésicos ineficazes em serpentes, não sendo recomendado para o alívio da dor (Posner e Chinnadurai, 2013).

3.5 Tramadol e O-desmetiltramadol (M1)

O tramadol(1RS,2RS)-2-[(dimetilamino)-metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol) é um opioide sintético, comercializado como uma mistura racêmica de dois enantiômeros: (+) tramadol (1R,2R)-2-[(dimetilamino)-metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol e (-) (1S,2S)-2-[(dimetilamino)-metil]-1-(3-metoxifenil)-ciclohexanol. A mistura racêmica de tramadol mostrou potência e eficácia analgésica superior à dos enantiômeros individuais, em que o enantiômero (+) tem uma baixa afinidade para os recetores μ , inibe a recaptação celular de serotonina e aumenta a liberação extracelular. E o enantiômero (-) inibe de forma mais eficiente a recaptação de noradrenalina e aumenta a sua liberação (Scoot e Perry, 2000; Grond e Sablotzki, 2004; Malana e Zohra, 2013). A fórmula molecular é representada por $C_{16}H_{25}NO_2$, massa molar 299,84g/mol e pka 9,41, sendo uma base fraca, solúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, clorofórmio e muito pouco solúvel em acetona; e solúvel água (Anvisa 2010). A estrutura química do tramadol está relacionada a codeína e a morfina, porém com substituição do grupo metil na metade fenólica, o que faz com que a molécula tenha menor afinidade com receptores opioides (Dayer et al.,1994). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o cloridrato de tramadol contém, no mínimo, 99,0% e, no máximo, 101,0% de $C_{16}H_{25}NO_2HCl$ em relação a substância anidra, quando se trata de SQR (substância química de referência). A lipossolubilidade do tramadol (log P) é de 1,35 em ph 7, sendo considerada um fármaco moderadamente lipossolúvel (Rigueira et al., 2008; Malana e Zohra, 2013; Kitamura 2014; Habibollahi et al., 2015).

O tramadol é um analgésico opioide atípico por apresentar mecanismo de ação misto. Este fármaco possui um perfil farmacodinâmico complexo com afinidade por receptores μ , receptores adrenérgicos e serotoninérgicos (Scott e Perry 2000). Evidências atuais demonstram que também possui efeitos moduladores em vários mediadores envolvidos na sinalização da

dor, como canais de sódio voltagem dependentes, receptores de glutamato, α 2-adrenoceptores, receptores de adenosina e mecanismos envolvendo a substância P que é o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a prostaglandina E2 e as citocinas pró-inflamatórias. O tramadol também atua modificando a sinalização entre células neuronais e não neuronais possuindo ação periférica e central, sendo recomendado para dores nociceptivas, inflamatórias e patológicas (Barakat, 2019).

O tramadol tem potência e afinidade por receptor μ baixa quando comparada a morfina. Entretanto, seu efeito analgésico é garantido principalmente pela inibição da recaptação da serotonina e da noradrenalina melhorando a transmissão monoaminérgica, assim o sinergismo dessas atividades garante efeitos analgésicos (Grond e Sablotzki, 2004).

O tramadol, apesar de fraca ligação, interage com receptores opioides que estão mais presentes no córtex cerebral, no tálamo e na substância cinzenta periaquedutal. Quando estimulados, estes receptores, resultam numa analgesia supra-espinhal, euforia, dependência física, tolerância, depressão respiratória, hipotermia, bradicardia e miose. Mas estes efeitos não são significativos quanto aos demais opioides μ puros, sendo que a dose, a via de administração empregada deve ser ajustada para a espécie. Sendo assim, de maneira geral, o tramadol produz mínimos efeitos no sistema respiratório, cardiovasculares e gastrointestinais tanto em humanos quanto nos animais (Cagnardi et al., 2011; Paolozzi et al. 2011; Norton et al., 2015). Ele tem sido utilizado em répteis, não sendo relatado, em sua maioria, depressão respiratória pronunciada ou outros efeitos adversos (Norton et al., 2015; Miotto et al., 2017; Doss 2021; Ting et al., 2021). Sendo indicado para dores leves a moderadas, com analgesia para dor somática e visceral aguda ou crônica (Bloor et al., 2012).

O uso de tramadol em cães e gatos é relatado em diferentes vias de administração e doses, produzindo nestas espécies eficácia analgésica, associada a estabilidade dos parâmetros hemodinâmicos, cardiorrespiratórios e melhora dos comportamentos associados à dor (Matrocinque e Fantoni, 2003; Kukanich e Papich, 2004; Pypendop e Ilkiw, 2008; Cagnardi et al., 2011).

O tramadol pode induzir a síndrome serotoninérgica quando utilizado em doses altas ou em conjunto com medicamentos que aumentam a atividade da serotonina, como por exemplo os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, antidepressivos tricíclicos, inibidores de monoaminas oxidase e a meperidina. Os sintomas variam de alterações comportamentais, excitabilidade neuromuscular à instabilidade motora (Cagnardi et al., 2011; Knych et al. 2013; Bravo et al., 2017). Outros efeitos adversos do uso de tramadol incluem náusea, vômito, fadiga, sedação e boca seca. A toxicidade do tramadol é dependente da dose, sendo a indução ao coma, movimentos clônicos, diminuição da temperatura corporal, hipotonia, alucinações, bradicardia, depressão respiratória grave e convulsões os sinais relatados (Williams, 1997; Hawkins, 2006; Barakat 2019).

O metabólito O-desmetiltramadol (M1) é um metabólito ativo do tramadol. É considerado uma base fraca representada pela fórmula química $C_{15}H_{23}NO_2$, altamente solúvel em solventes orgânicos e facilmente ionizáveis em pH fisiológico. A potência e o efeito analgésico, são maiores que do fármaco principal (Grond e Sablotzki, 2004). O M1 apresenta afinidade 300 vezes maior por receptores μ em relação ao composto original e é o principal metabólito agonista μ do tramadol que causa analgesia (Grond e Sablotzki, 2004; Haage, 2018).

3.5.1 Tramadol e o-desmetiltramadol (M1): farmacocinética e farmacodinâmica

O tramadol é comercializado de diversas maneiras, existem formulações orais, como comprimidos e cápsulas. E, existe também, supositórios para uso retal e soluções para uso intravenoso, intramuscular e subcutâneo (Grond e Sablotzki, 2004).

Pesquisas tem sido realizada para descobrir qual a melhor via de administração de um medicamento em répteis. A localização anatômica, o tamanho do animal e temperamento são características que são consideradas para a administração analgésica. Há evidências farmacológicas de que em répteis qualquer medicamento injetável, por via intramuscular, deve ser administrado nos membros anteriores, para evitar depuração anteriormente ao metabolismo do fármaco, devido ao efeito de primeira passagem pelo sistema porta-renal, diferenciado nos répteis (Sladky e Mans, 2012).

Um fármaco administrado por via intravenosa (IV), está totalmente disponível na circulação sanguínea (Doogue e Polasek, 2013). A mensuração da concentração deste em diferentes momentos após sua administração é uma ferramenta importante para compreender o comportamento no organismo em estudo (Urso et al., 2002).

Atualmente, estudos farmacocinéticos com o tramadol estão sendo amplamente desenvolvidos nas diferentes espécies, utilizando diferentes vias e identificando o papel do principal metabólito, o M1. As diferenças encontradas se referem principalmente às técnicas de detecção deste fármaco e de seus metabólitos, além de concentrações plasmáticas e meia vida de eliminação que diferem entre si (Kukanich e Papich, 2004; Pypendop e Ilkiw, 2008; Souza et al., 2009; Cagnardi et al., 2011; Stewart et al., 2011; Bortolami et al., 2015; Giorgi et al., 2015; Kimble et al., 2021).

3.5.1.1 Absorção do tramadol

Em humanos, a concentração minimamente eficaz capaz de causar analgesia para dor leve a moderadas foi relatada a partir de 100 ng/mL de tramadol, mas existem grandes variações entre os estudos, sendo encontrado na literatura doses mínimas de 590 ng/mL (Grond et al., 1999; Lintz et al., 2000; Kimble et al., 2021). Em tartarugas-cabeçudas (*Caretta caretta*) que receberam tramadol por via oral, 10 mg/Kg, a C_{max} (ng/mL) encontrada foi de 719 ± 331 com T_{max} de 14 ± 6,44 horas (Norton et al., 2015).

Numa administração intramuscular de 100 mg totais em humanos, o tramadol atingiu concentração máxima de 355 ± 86,2 ng/mL em 0,945 ± 1,07 horas (Chao et al., 2000). Já uma administração, em tigre d'água (*Trachemis scripta scripta*), por via intramuscular numa dose de 10mg/Kg de tramadol a C_{max} (ng/mL) foi de 58220 ± 25180 atingida em 0,7 ± 0,16 horas (Giorgi et al., 2015). Em humanos, o tramadol por via oral é rapidamente absorvido com biodisponibilidade de 68% após a primeira dose e 90% após doses repetidas (Grond e Sablostzki, 2004). Já a biodisponibilidade intramuscular de répteis, pode variar significativamente, dependendo do local de injeção, membros anteriores versus posteriores, mas também da variabilidade individual. Estudos relatam que aplicações intramusculares no membro posterior podem resultar em perda do fármaco por desvio do medicamento para o

fígado, chamado efeito de primeira passagem ou desvio porto-renal (Kummrow et al., 2008; Giorgi et al., 2015). A Tabela 1 demonstra a concentração de tramadol nas diferentes espécies.

Em cães também se nota bastante variabilidade quanto a biodisponibilidade do tramadol administrada por via oral. Contudo, mais investigações são necessárias para definir se os cães, assim como os humanos, possuem mutações genéticas que afetem a enzima responsável pelo metabolismo do tramadol, resultando variação na biodisponibilidade de tramadol após a administração oral (Benitez et al., 2015).

Num estudo realizado por Cagnardi et al. (2011) após a administração de tramadol na dose de 2mg/kg por via IV em felinos, a $C_{máx}$ de tramadol foi de $2,6 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$ e de M1 foi $0,81 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$ após 15 minutos da administração de tramadol. Em humanos, a analgesia produzida pelo tramadol ocorre 10 minutos após a sua administração pela via intramuscular, com duração de 4 a 6 horas (Dayer et al., 1994). O metabólito M1 deve atingir concentrações de 36 ng/mL em humanos para causar efeito analgésico (Kimble et al., 2021). A Tabela 2 demonstra as concentrações de M1 nas diferentes espécies.

Tabela 1. Dose, concentração máxima (C_{max}) e meia vida ($t_{1/2}$) do tramadol em diferentes espécies.

Animal	Dose (mg/kg)		C_{max} (ng/mL)		$t_{1/2}$ (h)		Referências
	Via IV	Outra via	IV	Outra via	Via IV	Outra via	
Tartarugas		5 e 10 (VO)		373 e 719		$20,35 \pm 21$ $22,67 \pm 23$	Norton et al. (2015)
Tigre d'agua	-	10 (IM)	-	58220	-	$28,7 \pm 15$	Giorgi et al. (2015)
Gatos	2	5,2 (VO)	1323	914	2,23	3.4	Pypendop e Ilkiw. (2008)
Cães	4,4	11,2 (VO)	$146,90 \pm 40,51$	$449,13 \pm 210$	$1,69 \pm 0,4$	$2,18 \pm 0,07$	Kukanich e Papich. (2004)

VO: via oral, IM: intramuscular; IV: intravascular

Tabela 2. Dose, concentração máxima (C_{max}) e meia vida (t_{1/2}) do M1 em diferentes espécies.

Animal	Dose(mg/kg)		C _{max} (ng/mL)		t _{1/2} (h)		Referências
	Via IV	IV	Outra via	Via IV	Outra via		
Tartarugas	-	-	655 e 1.376 (VO)	-	10,23 ± 6 11,26 ± 89	Norton et al. (2015)	
Tigre d'agua	-	3290	-	31,39 ± 7	-	Giorgi et al. (2015)	
Cães	1	146	449,13 (VO)	0,94	2,18 ± 0,55	Kukanich e Papich. (2004)	
Gatos	-	366	655 (VO)	4,35	4,81	Pypendop e Ilkiw. (2008)	

VO: via oral, IM: intramuscular; IV: intravascular

3.5.1.2 Distribuição e eliminação do tramadol

Uma vez que o medicamento é absorvido, este pode ficar sob a forma livre na corrente sanguínea, ligar-se a proteínas plasmáticas ou ser sequestrado para depósito nos tecidos. Somente o fármaco na forma livre é distribuído do sangue para o local de ação. A velocidade de distribuição depende de características físico-químicas do fármaco, assim como de fatores fisiológicos, como por exemplo da perfusão sanguínea, do débito cardíaco, da permeabilidade capilar, do volume tecidual, grau de ligação a proteínas plasmáticas e lipofilicidade (Whittem, 2017).

O volume de distribuição (V_d) fornece uma aproximação do volume necessário para conter todo o fármaco no corpo em concentração igual à do plasma, esse parâmetro é medido em litros (L) ou litros por quilograma (L/Kg). Quanto maior o valor do V_d de um fármaco, maior a capacidade do fármaco em se distribuir ou seja, se transferir do sangue para os variados tecidos do organismo, ficando indisponível para os órgãos excretores e prolongando a meia vida de eliminação (Reece, 2006). O tramadol possui extensa distribuição tecidual, com volume aparente de 3 L/Kg. As drogas básicas e lipofílicas com V_d superior a 3L/Kg apresentam elevada capacidade de serem sequestradas pelos tecidos (Lintz et al., 1986; Lee et al.,1993; Klotz, 2003; Skopp, 2004).

O tramadol sofre extensa biotransformação, envolvendo enzimas, como o citocromo P450 durante reações de fase I além de reações de fase II. Enzimas hepáticas da família CYP450, CYP3A4 e CYP2D6, convertem o tramadol em vários metabólitos, sendo a CYP2D6 a responsável em humanos por produzir o principal destes, o O-desmetiltramadol (M1) (Haage et al., 2018). Outro metabólito que pode ser formado, é o N-desmetiltramadol (M2), que é inativo. E ainda a partir do M1 e do M2 podem surgir três metabólitos secundários adicionais, são eles o N,N-didesmetiltramadol (M3), o N,N,O-desmetiltramadol (M4) e o N,O-didesmetiltramadol (M5). Os metabólitos desmetilados podem ainda sofrer biotransformação de fase 2, com reações de conjugação, glucurilação e sulfatação antes de serem eliminados pela urina. Este processo ocorre em diferentes velocidades nas diversas espécies de animais (Kukanich e Papich, 2004; Giorgi et al., 2007; Vettorato et al., 2010; Cagnardi et al., 2011; Knych et al., 2013; Bravo et al., 2017).

A enzima CYP2D15 é responsável pela produção do M1 em cães. Tanto o M1 quanto o M2 são transformados em M5, sendo o principal subproduto do metabolismo encontrado no plasma e na urina destes animais. Esta espécie não produz concentrações significativas de M1 após administração oral, epidural ou parenteral. Em gatos, no entanto, o M1 é produzido de forma significativa, com concentrações mais altas que estão relacionadas a maiores chances de efeitos adversos e a taxa de formação de M1 é 3,9 vezes mais rápida do que em cães (Kukanich e Papich, 2004; Cagnardi et al., 2011).

Cerca de 80% do tramadol é biotransformado pelo alelo CYP2D6, uma enzima que rapidamente pode apresentar-se saturada, pois possui baixa capacidade e alta afinidade, que representa até 5% do conteúdo de CYP no fígado em humanos (Miotto et al., 2017; Bravo et al., 2017). Os genes que codificam essas enzimas podem apresentar variação, o que implica em diferenças na disposição farmacocinética entre indivíduos (Obeng et al., 2017). O CYP450 contém enzimas que estão envolvidas no metabolismo de muitas toxinas, hormônios e produtos farmacêuticos. O alelo CYP2D6 é responsável pelo metabolismo de quase 25% dos fármacos e sua atividade metabólica exibe muita variação entre indivíduos, podendo ser atribuído a polimorfismos genéticos (Corado et al., 2016). Essas variações nas enzimas podem afetar o acúmulo de metabólitos, contribuindo para diferenças na eficácia e nos efeitos adversos desse fármaco,

podendo até mesmo não exercer os efeitos analgésicos esperados (Hassamal et al., 2018; Obeng et al., 2017).

A $t_{1/2}$, que é o tempo necessário para que a concentração plasmática se reduza à metade do valor inicial, é importante para estimar a duração de ação após uma única dose, também é importante para identificar o tempo necessário para a eliminação plasmática do medicamento (tempo de *washout*), a frequência que se deve administrar uma nova dose e o tempo necessário para alcançar o equilíbrio dinâmico (*steady state*) (Flório et al., 1999; Giorgi et al., 2015).

Em humanos, a $t_{1/2}$ do tramadol encontra-se entorno de sete horas. A média da $t_{1/2}$ encontrada em tigras-d'água e tartarugas-cabeçudas foi 28,7 e 22,67 horas, respectivamente (Giorgi et al., 2015; Norton et al., 2015). A $t_{1/2}$ do tramadol em gatos é mais longo que em cães. Tanto o tramadol, quanto o M1, têm $t_{1/2}$ mais curta em cães do que no homem, duas horas para cães, sendo recomendado intervalos de administração mais curtos para esta espécie em relação aos humanos. Já para os felinos, devido a deficiência da enzima glucuronil transferase, a biotransformação do tramadol e a eliminação do M1 é mais lenta.

Segundo Cagnardi et al. (2011), o declínio da produção de M1 foi lenta em felinos, e na última coleta sanguínea, após oito horas, foi relatado o valor de 0,11 mcg/ml. Já a concentração de tramadol nesse momento era de 0,05 mcg/ml. Após duas horas, a concentração sanguínea do metabólito era maior do que o composto original.

O Clearance (Cl) do tramadol que representa a capacidade do organismo de eliminar um fármaco do plasma de forma irreversível (Klotz, 2003; Ruel e Stegall, 2019), em humanos, ocorre quase exclusivamente por via renal, de modo que cerca de 90% do fármaco é excretado na urina, além disso, 10 a 30% do fármaco é excretado não biotransformado, enquanto 60% é excretado como um metabólito (Grond e Sablostzki, 2004). A Tabela 3 demonstra resumidamente alguns parâmetros farmacocinéticos do tramadol e do M1 relatada em diferentes espécies.

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos para o tramadol e O-desmetiltramadol em humanos e outras espécies (adaptado de Kimble et al., 2021).

Representante	Clearance mL/Kg/min	Volume de distribuição L/Kg	t _{1/2} (h) tramadol	t _{1/2} (h) M1
Humano	7-8	2,7*	5,5	6-7
Coala	39,40 ± 13,36*	8,60 ± 2,33*	2,65 ± 1,03**	25,09 ± 0,04**
Cães	54,63 ± 8,19	3,79 ± 0,93	1,80 ± 1,2	1,7
Gatos	20,8 ± 3,2	5,1 ± 0,3	*** Aproximadamente 1-3	4,5
Equinos	26 ± 3	2,17 ± 3*	1,38 ± 0,17	-

*Aparente clearance ou aparente volume de distribuição

** 4mg/kg subcutâneo

***oral

3.6 Princípios da cromatografia líquida de alta eficiência e validação de método analítico

Os fluidos biológicos, como o sangue, a urina, a saliva e o líquido cefalorraquidiano possuem inúmeros componentes endógenos e exógenos como proteínas, hormônios, componentes celulares, sais, entre outros, capazes de interferir na quantificação de uma substância. Para a escolha da matriz biológica mais adequada para extração do analgésico, fatores como o tipo de fármaco, o objetivo da análise, o tempo desde a administração e o tipo de paciente devem ser consideradas (Jardim, 2010).

Em medicina veterinária, para determinação da farmacocinética do tramadol e do metabólito M1, o plasma fornece uma concentração mais adequada da concentração do fármaco livre no sangue, já que além de ser uma matriz mais simples, quando comparada ao sangue total, contém proteínas plasmáticas, que estão, muitas vezes, ligadas ao fármaco, portanto fornece uma concentração mais representativa (Kukanich e Papich, 2004; Giorgi et al., 2015; Jimenez et al., 2019; Kimble et al., 2021).

O tramadol liga-se a proteínas plasmáticas em cerca de 20% (Grond e Sablostzki, 2004), pode ser identificado no plasma por CLAE-FL mesmo em baixas concentrações, mas antes de iniciar as técnicas analíticas capazes de determinar o fármaco nos fluidos biológicos a amostra de plasma precisa ser submetida a um pré-tratamento (Kukanich e Papich, 2004; Giorgi et al., 2015).

O pré-tratamento das amostras tem como objetivo retirar interferentes, como proteínas e células sanguíneas, evitando danos ao equipamento de cromatografia, e, também promover a extração do analgésico da matriz biológica. O método de preparo de amostras é uma etapa importante e demorada no processo de determinação dos analitos de interesse. Apesar de novas tecnologias e evolução das técnicas, o pré-tratamento pode ser considerado um desafio para o método analítico, principalmente o de análise de fármacos (Jardim, 2010; Ansari et al., 2017).

Existem várias técnicas de preparo de amostras biológicas, dentre elas, a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido (LLE- Liquid-liquid Extraction) e a extração em fase sólida (SPE – Solid Phase Extraction). A escolha da técnica deve levar em consideração a seletividade, bem como rapidez e simplicidade, a fim de evitar riscos de erros analíticos, capacidade tecnológica e custos. E, atualmente, uma preocupação ambiental tem sido considerada na seleção do método (Jardim, 2010; Yang et al., 2013; Andrade-Eiroa et al., 2016; Kataoka et al., 2016; Niu et al., 2018; Rydlewski, et al., 2020).

A precipitação de proteínas, técnica utilizada no preparo de amostras convencionais, consiste em adicionar um reagente precipitante adequado para a amostra, a fim de fazer um “clean up” na matriz. Porém, o uso isolado desta técnica pode ser ineficiente para eliminar todos os interferentes, levando a um comprometimento da seletividade do método, assim como da precisão e exatidão em baixas concentrações do analito (Jardim, 2010).

A extração LLE, técnica de separação conhecida como extração por solvente, é utilizada para a separação e concentração de analitos presentes em matrizes complexas, como amostras ambientais, biológicas e alimentícia. Os analitos serão distribuídos em duas fases imiscíveis líquidas, uma aquosa e outra orgânica. A escolha das fases depende das propriedades químicas dos analitos e da matriz da amostra. Geralmente, a fase orgânica é um solvente imiscível em água. Neste tipo de técnica, a perda do analito pode ocorrer mais facilmente e, além disso, existe maiores chances de contaminação. Se esta técnica for a de escolha, deve-se ter maiores cuidados para com os solventes tóxicos, a fim de garantir a segurança dos profissionais, do laboratório e do ambiente (Rydlewski et al., 2020).

A extração SPE, é uma técnica mais seletiva quando comparada as anteriores, determinando amostras mais livres de interferentes e uma extração mais completa do analito de interesse. Quando compara à LLE, a SPE tem a vantagem de ser mais rápida, econômica em relação ao gasto de solventes orgânicos, gerando menores quantidades de resíduos orgânicos, e com menor manipulação da amostra. A extração em SPE consiste no emprego de colunas, em formas de barril ou seringa, parcialmente preenchidas com fases sólidas particuladas, no qual a fase sólida tem a capacidade de interagir seletivamente com os compostos de interesse, permitindo a separação dos demais componentes. Os compostos indesejados são retidos pela fase sólida, e os analitos eluidos com um solvente adequado (Andrade-Eiroa et al., 2016; Kataoka et al., 2016).

Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico de separação dos componentes de uma amostra distribuídos em duas fases, uma é a estacionária e a outra se move numa direção definida (Assis, 2015; Rydlewski et al., 2020).

O sistema de cromatografia líquida é basicamente composto pelo solvente, também chamado de fase móvel ou eluente, bomba de alta pressão que faz a fase móvel migrar a um fluxo constante através da coluna, válvula de injeção automática ou manual, coluna ou fase estacionária que pode ser preenchida por uma infinidade de compostos, detector que pode ser de vários tipos, sistema de aquisição e descarte (Degani et al., 1998; Assis, 2015; Rydlewski et al., 2020).

Os componentes da amostra devem ser separados na coluna e detectado pelo detector. A fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel e estas duas são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre elas com distintas afinidades entre esses dois componentes. Na cromatografia em fase reversa, os analitos muito polares interagirão fortemente com a fase móvel e serão menos retidos, sendo os primeiros a saírem da coluna. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse, o que permite a identificação destes (Assis, 2015; Rydlewski et al., 2020). O cromatograma será registrado como uma curva gaussiana (Collins, 2006).

Na técnica de CLAE ocorre a interação entre a fase estacionária, o soluto e a fase móvel. E nela existem subdivisões em modos cromatográficos, sendo as principais o CLAE em fase normal, CLAE em fase reversa e o CLAE de troca iônica (Collins, 2006; Rydlewski et al., 2020).

A cromatografia em fase normal é definida por uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar. A cromatografia em fase reversa (RP-LC) é definida por uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar e a cromatografia de troca iônica terá cargas na fase estacionária que devem ser opostas à carga do analito de interesse, para que ele fique retido na coluna. E a fase móvel é composta por cargas iguais a do analito, para competir com a coluna (Collins, 2006; Rydlewski et al., 2020).

Desde 1970, a cromatografia em fase reversa é o modo cromatográfico mais utilizado e, normalmente é a primeira escolha para a separação de compostos neutros ou ionizáveis, já que é o método mais conveniente, robusto e versátil. As colunas de fase reversa apresentam uma ampla variedade, sendo assim mais eficientes e os solventes são polares, menos inflamáveis, menos tóxicos e mais compatíveis com detector ultravioleta (Maldaner et al., 2010).

Vários detectores cromatográficos podem ser utilizados para determinação de analitos na CLAE. O detector será capaz de “enxergar” ou detectar os constituintes provenientes da amostra e separados após a passagem pela coluna respondendo por mecanismos variados e que são transformados em sinais elétricos que são registrados em picos (Degani et al., 1998; Lanças, 2009).

Os detectores devem apresentar ampla faixa de aplicação, proporcionando identificação e quantificação contínua da amostra. Além disso, alta sensibilidade, estabilidade (alteração na temperatura e vazão da fase móvel não devem alterar o sinal), reprodutibilidade, resposta linear (a resposta do detector deve variar linearmente com a concentração do analito numa faixa de concentração), resposta rápida aos analitos, não contribuir para o alargamento do pico, confiabilidade, facilidade de manuseio e ser seletivo (capacidade do detector de identificar inequivocadamente, um composto e não outro) (Degani et al., 1998; Peres, 2002).

Os detectores por fluorescência (FL) são mais sensíveis que os detectores por ultravioleta visível, mas nesse caso é necessário que o componente de interesse seja fluorescente. Em condições normais a maior parte das moléculas se encontra no nível energético mais baixo do estado eletrônico (estado fundamental). A absorção de um quantum de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia (estado excitado). Na fluorescência, a absorção molecular de um fóton desencadeia a emissão de outro fóton com maior comprimento de onda, essa diferença nos comprimentos de onda (absorção vs. Emissão) fornece mais seletividade e a luz fluorescente é medida contra um fundo de pouca luz (Peres, 2002; Wolfender, 2009).

Kukanich e Papich (2004) utilizaram as publicações de Gan e Ismail (2001) e Nobbis et al. (2002) com algumas pequenas melhorias para detectar o tramadol e determinar a farmacocinética em cães através de CLAE-FL. Giorgi et al (2015) investigou a farmacocinética e a farmacodinâmica do tramadol em tartarugas de barriga amarela a partir de equações não compartimentais. Os autores utilizaram a técnica de CLAE-FL para detectar tramadol e o metabolito M1 em plasma. Souza et al. (2009) também utilizou o CLAE-FL para detectar e posteriormente avaliar a farmacocinética do tramadol administrado por via intravenosa (IV) e via oral (VO) em aves de rapina.

Na literatura veterinária, a detecção por CLAE- FL tem sido frequentemente utilizada para análises de tramadol (Kukanich e Papich, 2004; Giorgi et al., 2015; Kimble et al., 2021). Além dessa técnica, a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-LC/MS) tem sido relatada para análise de fármacos em amostra biológica. Este acoplamento reúne duas metodologias poderosas, a cromatografia líquida e a espectrometria de massas, determinando o aumento do poder da separação, fornecido pela cromatografia, e a alta seletividade e detecção pela massa e carga dos analitos, fornecida pela espectrometria de massas (Pypendop e Ilkiw, 2008; Kimble et al., 2021).

A seleção do padrão interno (Pi) é uma padronização muito utilizada durante a validação de um método, tem o objetivo de corrigir possíveis variações na extração, preparação e análise da amostra, garantindo a precisão e a exatidão da metodologia analítica (Cassiano, 2009; Ribani et al., 2004).

O composto utilizado como padrão interno deve ser adicionado em todas as amostras com o objetivo de corrigir as variações na análise. A escolha do Pi deve estar baseada na similaridade de propriedades físico-químicas e espectrais do analito de interesse desde que possua um sinal de detecção diferente, permitindo correções de variações analíticas, tais como variações na eficiência da extração, degradação do analito e perdas de amostra (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009). A ondansetrona, apresenta a fórmula molecular $C_{18}H_{19}N_3O$ com peso molecular de 293,36g/mol e log P 2,4. É um composto compatível para ser utilizado como Pi na análise cromatográfica do tramadol e do metabólito ativo, sendo adicionada às amostras numa concentração conhecida e constante, permitindo sua quantificação juntamente com os analitos de interesse para permitir correção das variações na análise, resultando em dados mais confiáveis.

Durante o desenvolvimento do método analítico, diferentes fases móveis são testadas para que seja realizada a melhor escolha (Menegheti, 2013). Para o CLAE em fase reversa, a polaridade da fase móvel é maior que a coluna. Esta fase móvel é constituída, em maioria, de uma mistura de água: acetonitrila ou água: metanol. Porém, outros solventes orgânicos como o isopropanol e o tetrahydroflurano também podem ser utilizados, apesar de já terem sido consideradas menos satisfatórias (Snyder et al., 2010). As proporções entre os solventes podem ser alteradas a fim de se ajustar a força de eluição da coluna e otimizar a separação. Para se estabelecer uma relação entre as diferentes seletividades dos solventes de extração, criou-se uma ferramenta para medir o poder de solvatação de um solvente: o triângulo de seletividade (Snyder et al., 1997). O triângulo de seletividade é baseado em três parâmetros, são eles, o parâmetro de basicidade, de acidez e o parâmetro dipolo (Snyder et al., 2010).

3.7 Parâmetros de validação do método

3.7.1 Seletividade

A seletividade também chamada de fator de separação de um método analítico é a capacidade de verificar de forma inequívoca o ativo de escolha na presença de compostos interferentes eluindo nos tempos de retenção dos analitos de interesse. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (Ribani et al., 2004).

O sucesso de um método cromatográfico depende de como as condições experimentais afetam a separação. Portanto, seletividade é a primeira etapa no desenvolvimento e validação de um método e deve ser reavaliada continuamente (Ribani et al., 2004).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras, uma delas é a comparação dos cromatogramas gerados a partir da amostra branca, matriz utilizada sem adição do analito e do Pi, com o objetivo de zerar o aparelho, com os cromatogramas obtidos com a solução padrão do analito e do Pi. Nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do fármaco de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (Lemos et al., 2000; Ribani et al., 2004).

3.7.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração real do analito em estudo dentro de um intervalo específico (Ribani et al., 2004). É verificada pela equação de regressão linear, $y = ax + b$, onde y é o resultado de razão de área do pico, x é a concentração do analito, “ a ” é a inclinação da reta de calibração ou também chamada de sensibilidade e b é onde a reta se encontra com o eixo x . Além dos coeficientes de regressão “ a ” e “ b ”, também é possível calcular, o coeficiente de determinação (R^2). Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (Ribani et al., 2004).

3.7.3 Precisão

A precisão é a capacidade de verificar se o método analítico é correto para o objetivo da análise. A precisão e a exatidão referem-se, respectivamente, à capacidade do método em fornecer dados com baixa dispersão e resultados de concentração próximos aos valores reais (Ribani et al., 2004).

A precisão, independentemente da quantidade de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea, pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR), pelo intervalo de confiança da média ou pelo coeficiente de variação (CV) (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009). Os desvios padrões relativos (DPRs) inferiores a 15% e valores de recuperação entre 80 e 110% para os três níveis de concentração (baixo, médio e alto) são considerados adequados (AOAC, 2016).

A precisão é dividida em três níveis diferentes: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade (Ribani et al., 2004).

A repetibilidade ou precisão intra-ensaio representa a concordância entre análises sucessivas de amostra controle de qualidade. Essas amostras devem ser avaliadas em curto intervalo de tempo, efetuadas sob as mesmas condições (equipamento, laboratório, analista e reagente) e usando o mesmo método (Ribani et al., 2004).

A precisão intermediária refere-se ao efeito das variações dentro do mesmo laboratório. O objetivo dela é indicar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados independente dos diferentes dias, analistas ou equipamentos (Ribani et al., 2004).

A reprodutibilidade atesta que diferentes laboratórios, com equipamentos e analistas diferentes, conseguem realizar o método, utilizando a mesma amostra. Sendo assim, a colaboração de outros laboratórios pode ser de grande valia para testar a precisão do método (Ribani et al., 2004).

3.7.4 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados individuais e um valor aceito como verdadeiro, ou seja, tem o objetivo de fornecer dados com baixa dispersão e resultados de concentração próximos aos valores reais (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009)

A ANVISA estabelece que o mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser eleito. Assim como a precisão, tem como objetivo determinar os erros de uma medida analítica (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009).

A exatidão está correlacionada a valores de precisão e as etapas mais utilizadas para avaliação desse parâmetro são: ensaios de recuperação, materiais de referência, comparação de métodos e adição de padrão (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009).

As diretrizes da ANVISA preconizam que a precisão e a exatidão devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, 3 controles de qualidades (CQ), preparadas da mesma matriz biológica, analisados em sextuplicata de preparo de amostras, com níveis de concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração. Estes limites podem ser estreitos em concentrações mais elevadas e mais amplos em níveis de traços (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009).

3.7.5 Limites inferiores de quantificação

O LIQ (Limite inferior de quantificação) tem como objetivo demonstrar a habilidade do método em quantificar baixas concentrações do analito. Logo, o LIQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de detecção (LOD) pode ser realizado através da análise de amostras branco adicionadas do analito em concentrações decrescentes, até se obter níveis que sejam quantificados com valores aceitos de precisão e exatidão (Ribani et al., 2004; Cassiano, 2009).

3.7.6 Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco numa matriz biológica refere-se à capacidade de garantir que a concentração do fármaco não sofreu alteração, ou seja, que integridade química foi preservada desde a coleta, durante o processamento e armazenamento (Van et al., 2014).

Esta estabilidade depende de vários fatores como de propriedades químicas do analito, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (United States, 2001). A falta de estabilidade pode levar a mudanças na concentração do analito, bem como na matriz, o que pode afetar a precisão e exatidão dos resultados (Van et al., 2014). Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras

em temperatura ambiente e ciclos de congelamento e descongelamento. As amostras são consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20% (Brasil, 2012).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-SANTOS, S.M., BRAZ, H.B., SANTOS, L. et al. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetologia Brasileira*, v. 3, p.14-24, 2014.

ANDRADE-EIROA, A., CANLE, M., LEROY-CANCELLIERI, V., & CERDÀ, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.80, p. 655-667.

ANSARI, S.; KARIMI, M. Recent progress, challenges and trends in tracedetermination of drug analysis using molecularly imprinted solid-phase microextraction technology. *Talanta*, 164, p. 612-625, 2017.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Brasília, 2010. p. 870-871.

AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. United States of America, 2016. p. 1-18.

ASSIS, D. Validação de metodologia analítica por UPLC/MS-MS para avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em músculo de frangos de corte após tratamento. 2015. 72f. Tese. Pós graduação em Ciência Animal - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AYERS, H. Pain recognition in reptiles and investigation of associated behavioural signs. *The Veterinary Nurse*, v. 7, n. 5, p. 292-300, 2016.

BAKER, B.; SLADKY, K.; JOHNSON, S. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.238, n.2, p. 220-227, 2011.

BARAKAT, A. Revisiting tramadol: a multi-modal agent for pain management. *CNS drugs*, v. 33, n. 5, p. 481-501, 2019.

BAUER, A; BAUER, G. Squamata –sauria (Iguana e Lagartos) In: CUBAS; SILVA; CATÃO-DIAS. (2ªED). Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2014, 170-185p.

BEAKLEY, B.D.; KAYE, A.M.; KAYE, A.D. Tramadol, pharmacology, side effects, and serotonin syndrome: A Review. *Pain Physician*, v.18, n.4, p.395-400, 2015.

BENITEZ, M. E.; ROUSH, J. K.; KUKANICH, B. et al. Pharmacokinetics of hydrocodone and tramadol administered for control of postoperative pain in dogs following tibial plateau leveling osteotomy. *American Journal of Veterinary Research*, v.76, n.9, p.763-770, 2015.

BENNETT, R. A. Neurology. In: MADER, D. R. (1Ed.). Reptile medicine and surgery. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 141–148.

BLOOR, M.; PAECH, M. J.; KAYE, R. Tramadol in pregnancy and lactation. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, v. 21, p. 163–167, 2012.

BOBACK, S.M.; LYNN, M.S. Variation in color and color change in Island and Mainland Boas (*Boa constrictor*). *Journal of Herpetology*, v.44, n.4, p.506-515, 2010.

BORTOLAMI, E.; DELLA ROCCA, G., DI SALVO, A. et al. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep. *Veterinary Journal*, v. 205, n. 3, p. 404–409, 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº27/2012, de 17 de maio de 2012 – Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 mai.2023.

BRAVO, L.; MICO, J. A.; BERROCOSO, E. Discovery and development of tramadol for the treatment of pain. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 12, n. 12, p. 1281-1291, 2017.

CAGNARDI, P.; VILLA, R.; ZONCA, A. et al. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. *Res Vet Sci*, v.90, p.503-509, 2011.

CAMARGO, J. P.; FUTEMA, F.; BECHARA, J. N. Dor em pequenos animais: como estabelecer um diagnóstico preciso e precoce? *Nosso Clínico*, v.10, n. 59, p. 24-30, 2007.

CAMARGO, J. P.; FUTEMA, F.; BECHARA, J. N. Dor em pequenos animais: como estabelecer um diagnóstico preciso e precoce. *Nosso Clínico*, v. 59, p. 24-30, 2007.

CARVALHO, R.; PARSONS, H. Manual de cuidados paliativos ANCP. In: Manual de cuidados paliativos, p.590-590, 2012.

- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v.32, n.4, p.1021-1030, 2009.
- CHAO, C. K.; YU, L. L.; LIU, C. M *et al.* Bioequivalence study of tramadol by intramuscular administration in healthy volunteers: Randomized controlled trial. *Arzneimittelforschung*, v. 50, n. 7, p. 636-640, 2000.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S (Ed). Fundamentos da cromatografia. São Paulo: UNICAMP, 2006. p. 400-453.
- CORADO, C. R., MCKEMIE, D. S., YOUNG, A. *et al.* Evidence for polymorphism in the cytochrome P450 2D50 gene in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.39, n.3, p. 245-254, 2016.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 4, n. 3, p. 75-94, 2015.
- DALGALARRONDO, P. Os vertebrados: um mesmo plano para todos os encéfalos. In: DALGALARRONDO, P. Evolução do cérebro: sistema nervoso, psicologia e psicopatologia sob a perspectiva evolucionista. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- DARROW, B.; MYERS, G.; KUKANICH, B. *et al.* Fentanyl transdermal therapeutic system provides rapid systemic fentanyl absorption in two ball pythons (*Python regius*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v.26, n.3-4, p. 94-99, 2016.
- DAYER, P.; COLLART, L; DESMEULES, J. The pharmacology of tramadol. *Drugs*, v. 47, p. 3-7, 1994.
- DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova*, v. 7, n. 1 p. 21-25, 1998.
- DERVAS, E.; MICHALOPOULOU, E.; LIESEGGANG, A. *et al.* Haematology, biochemistry and morphological features of peripheral blood cells in captive Boa constrictor. *Conservation Physiology*, v.11, n.1, coad001, 2023.
- DI GIROLAMO, N.; MANS, C. Reptile Soft Tissue Surgery. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, n. 19, v. 1, p. 97-131, 2016.
- DOOGUE, M. P.; POLASEK, T. M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, v. 4, n. 1, p. 5-7, 2013.

DOSS, G. A.; MANS, C.; SLADKY, K. K. Analgesia, Anesthesia, and Monitoring. *Exotic Animal Emergency and Critical Care Medicine*, pag. 746-757, 2021.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 55, p. 135-146, 2005.

DUNTON, A. D.; GÖPEL, T.; HO, D. et al. Form and function of the vertebrate and invertebrate blood-brain barriers. *International Journal of Molecular Sciences*, v.22, n.22, p. 1-40, 2021.

EATWELL, K. Options for analgesia and anaesthesia in reptiles. *In Practice*, v.32, n.7, p. 306-311, 2010.

FANTONI D.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia da Dor Aguda. In: Fantoni D. Tratamento da Dor na Clínica de Pequenos Animais. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p 58-72.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 5e.d. Brasília: Anvisa 2010. p.870

FIORINI, L. C.; CRAVEIRO, A. B.; MENDES, M. C. et al. Morphological and molecular identification of ticks infesting *Boa constrictor* (Squamata, Boidae) in Manaus (Central Brazilian Amazon). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 23, p. 539-542, 2014.

FISCHER, M. L.; LIBRELATO, R. F.; CORDEIRO, A. L et al. A percepção da dor como parâmetro de status moral em animais não humanos. *Conexão Ciência*, v.11, n.2, p.31-41, 2016.

FLÓRIO, J. C., SOUSA, A. B. Farmacocinética. In: SPINOSA, H. S.; BERNARDI, M. M.; GÓRNIK, S. (6ªEd). Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: GEN-Guanabara Koogan, 2017. p. 44.

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

GAN, S.H.; ISMAIL, R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for tramadol and o-desmethyltramadol in human plasma using solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v.759, p. 325–335, 2001.

GARCIA, V. C.; VAC, M. H., BADIGLIAN, L. et al. Avaliação ultrassonográfica do aparelho reprodutor em serpentes vivíparas da família Boidae. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, p. 311-318, 2015.

- GIORGI, M.; SALVADORI, M.; DE VITO, V et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessments of 10 mg/kg tramadol intramuscular injection in yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.38, n.5, p. 488-496, 2015.
- GIORGI, M.; SOLDANI, G.; MANERA C. et al. Pharmacokinetics of tramadol and its metabolites M1, M2 and M5 in horses following intravenous, immediate release (fasted/fed) and sustained release single dose administration. *J Equine Vet Sci*. v.27, p.481-488, 2007.
- GOLDBERG, M. E. How to be a pain management advocate for exotic and zoo animals. *The Veterinary Nurse*, v. 8, n. 7, p. 389-397, 2017.
- GORNIK, S.; DE SOUZA, H. Farmacologia Veterinária: considerações sobre farmacocinética que contribuem para explicar as diferenças de respostas observadas entre as espécies animais. *Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v.8, n. 1, p.15, 1995.
- GREGO, K. F. Determinação dos níveis séricos de corticosterona e hormônios esteróides sexuais, induzidos pelo estresse da contenção física e da extração de veneno, em *Bothrops jararaca* (Ophidia: Viperidae). 2006. Tese. Programa de pós-graduação em Patologia experimental comparada. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GROND, S.; MEUSER, T.; URAGG, H. et al. Serum concentrations of tramadol enantiomers during patient-controlled analgesia. *British journal of clinical pharmacology*, v.48, n.2, p. 254-257, 1999.
- GROND, S.; SABLITZKI, A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clinical Pharmacokinetics*, v.43, n.13, p. 879-923, 2004.
- GROSENBAUGH, D. A.; REINEMEYER, C. R.; FIGUEIREDO, M. D. Pharmacology and therapeutics in donkeys. *Equine Veterinary Education*, v. 23, n. 10, p. 523–530, 2011.
- HAAGE, P.; KRONSTRAND, R.; JOSEFSSON, M. et al. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol and its three main metabolites; impact of CYP2D6, CYP2B6, and CYP3A4 genotype. *Pharmacology research & perspectives*, v.6, n.4, 2018.
- HABIBOLLAHI, S.; TAVAKKOLI, N.; NASIRIAN, V.; KHANI, H. Determination of Tramadol by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with GC–MS. *Journal of Chromatographic Science*. v. 53, p. 655-661, 2015
- HASSAMAL, S.; MIOTTO, K., DALE, W. et al. Tramadol: Understanding the Risk of Serotonin Syndrome and Seizures. *American Journal of Medicine*, v. 131, n. 11, p. 1382.e1-1382.e6, 2018.

- HAWKINS, S. J.; COX, S.; YAW, T. J. et al. Pharmacokinetics of subcutaneously administered hydromorphone in bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 46, n. 3, 2019.
- HEDLEY, J.; JOHNSON, R.; YEATES, J. Reptiles (Reptilia). *Companion Animal Care and Welfare: The UFAW Companion Animal Handbook*, p. 371-394, 2018.
- HELLEBREKERS, L. J. *Dor em Animais*. São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79.
- HIINAREJOS, D. P.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. Ofídios. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. (Ed.). *Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos*. São Paulo: Interbook, 2007. p. 119-140.
- HOLZ, P. H., BURGER, J. P., PASLOSKE, K., et al. Effect of injection site on carbenicillin pharmacokinetics in the carpet python, *Morelia spilota*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v.12, n.4, p. 12–16, 2002.
- JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- KATAOKA, H; ISHIZAKI, A; SAITO, K. Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications. *Analytical Methods*, v. 8, n. 29, p. 5773-5788, 2016.
- KERRIGAN, S. E GOLDBERGER, A. B. Opioids. In: Levine, B. (ed.). *Principles of Forensic Toxicology*. 2ªed. Washington. *American Association for Clinical Chemistry*, p. 225–242, 2003.
- KHARBUSH, R. J., GUTWILLIG, A., HARTZLER, K. E. et al. Antinociceptive and respiratory effects following application of transdermal fentanyl patches and assessment of brain μ -opioid receptor mRNA expression in ball pythons. *American journal of veterinary research*, v.78, n.7, p. 785, 2017.
- KIMBLE, B., VOGELNEST, L., VALTCHEV, P., & GOVENDIR, M. Pharmacokinetic profile of injectable tramadol in the koala (*Phascolarctos cinereus*) and prediction of its analgesic efficacy. *Plos one*, v.16, n.3, 2021.
- KITAMURA, A.; HIGUCHI, K.; OKURA, T. et al. Transport characteristics of tramadol in the blood–brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.103, n.10, p. 3335-3341, 2014.
- KLOTZ, U. S. Tramadol - the impact of its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties on the clinical management of pain. *Arzneimittelforschung*, v 53, n. 10, p. 681-687, 2003.

KNYCH, H.K.; CORADO, C.R.; MCKEMIE, D.S. et al. Pharmacokinetics and selected pharmacodynamic effects of tramadol following intravenous administration to the horse. *Equine Vet J*, v.45, p. 490-496, 2013.

KUKANICH, B.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *J Vet Pharmacol Ther*, v.27, p. 239-246, 2004.

KUMMROW, M. S., TSENG, F., HESSE, L. et al. Pharmacokinetics of buprenorphine after single-dose subcutaneous administration in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, p. 590-595, 2008.

LAMONT, L. Multimodal pain management in veterinary medicine: the physiologic basis of pharmacologic therapies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.38, p. 1173– 86, 2008.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente“compatíveis”. *Scientia Chromatographica*, v.1, p. 35-61, 2009.

LE MERRER, J.; BECKER, J.A.; BEFORT, K. et al. Processamento de recompensa pelo sistema opióide no cérebro. *Physiological reviews*, v.89, n.4, p. 1379-1412, 2009.

LEE, C. R.; MCTAVISH, D.; SORKIN, E. M. Tramadol. a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs*, v. 46, n. 2, p. 313-340, 1993.

LEMONS, N. P.; ANDERSON, R. A.; ROBERTSON, J. R. The analysis of methadone in nail clippings from patients in a methadone-maintenance program. *Journal of analytical toxicology*, v.7, n.24, p. 656-660, 2000.

LIMA, O. T.; SALDANHA, A.; MYLLER, G. et al. Manejo reprodutivo de jiboias e outros boídeos criados em cativeiro. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.43, n.2, p. 276-283, 2019.

LINTZ, W.; BARTH, H.; OSTERLOH, G.; SCHIMDT-BÖTHELT, E. Bioavailability of enteral tramadol formulations. 1st communication: capsules. *Arzneimittelforschung*, v. 36, n.8, p. 1278-1283, 1986.

LINTZ, Wolfgang et al. Pharmacokinetics of tramadol and bioavailability of enteral tramadol formulations 4th communication: Drops (without ethanol). *Arzneimittelforschung*, v.50, n.02, p. 99-108, 2000.

MALANA, M.; ZOHRA, R. The release behavior and kinetic evaluation of tramadol HCL from chemically cross-linked Ter polymeric hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.21, n.1, p.1-10, 2013.

MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v.33, n.7, p. 1559-1568, 2010.

MARTILL D.M.; TISCHLINGER H, LONGRICH N.R. A four-legged snake from the Early Cretaceous of Gondwana. *Science*, v.349, p. 416-419, 2015

MASTROCINQUE, S.; FANTONI, D. T. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. *Veterinary anaesthesia and analgesia*, v.30, n.4, p. 220-228, 2003.

MATTHEWS, K.; KRONEN, P.W.; LASCELLES D. et al. WSAVA Guidelines For Recognition, Assessment And Treatment Of Pain. *Journal of Small Animal Practice*, v.6, n.3, p.164-173, 2015.

MCKUNE, C.; MURRELL, J.; NOLAN, A. et al. Nociceção e Dor. In: GRIMM, K et al. (5ª Ed). *Anestesiologia e Analgesia em Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2017. p.576-617.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, Aníbal Rafael. Criação e manejo de serpentes. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*, p. 388, 2002.

MENDELL, L. M. Constructing and Deconstructing the Gate Theory of Pain. *Pain*, v.155, n.2, p. 210–216, 2014

MENEGHETI, T. Diferentes taxas de infusão de tramadol na analgesia trans e pós-operatória imediata em cães submetidos a procedimentos ortopédicos. 2013. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-Unesp, Araçatuba.

MIOTTO K.; CHO A.K.; KHALIL M.A. et al. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. *Anesthetic Clinical Pharmacology*, v. 124, n. 1, p. 44–51, 2017.

MONROY-VILCHIS, O.; SÁNCHEZ, Ó.; URIOS, V. Consumo de un jaguarundi adulto Puma yagouaroundi (Felidae) por la serpiente Boa constrictor (Boidae) en el centro de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v.82, n.1, p. 319-321, 2011.

MOON, B. R.; PENNING, D. A.; SEGALL, M. et al. Feeding in snakes: form, function, and evolution of the feeding system. *Feeding in vertebrates: Evolution, morphology, behavior, biomechanics*, p. 527-574, 2019.

MOSLEY, C. Pain and Nociception in Reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, v. 14, p. 45-60, 2011.

MUIR, W. Pain and stress. In. GAYNOR, J. S.; MUIR, W. W (2ªEd). Handbook of Veterinary Pain Management. St Louis: Mosby. Elsevier, 2008, p. 42-55.

MYERS, D. Tramadol. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 14, n. 4, p. 284-287, 2005.

NAGY, K. A. Field metabolic rate and body size. *Journal of Experimental Biology*, v.208, n.9, p.1621–1625, 2005.

NIU, Z; ZHANG, W; YU, C; ZHANG, J. et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, n.1, p.123-146, 2018

NOBILIS, M., KOPECKY, J., KVETINA, J. et al. High-performance liquid chromatographic determination of tramadol and its O-desmethylated metabolite in blood plasma. Application to a bioequivalence study in humans. *Journal of Chromatography A*, 949, p. 11–22, 2002.

NORTON, T.M.; COX, S.; NELSON, J. et al. Farmacocinética de tramadol e O-desmetiltramadol em tartarugas marinhas cabeçadas (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.46, n.2, p. 262-265, 2015.

O'MALLEY, B. Anatomy and Physiology of Reptiles. *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice*, p. 15–32, 2017.

OBENG, A. O.; HAMADEH, I.; SMITH, M. Review of Opioid Pharmacogenetics and Considerations for Pain Management. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 37, p. 1105–1121, 2017.

OLSSON, A; SIMPSON, M. Analgesia and anaesthesia. *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice*, p. 369-381, 2017.

PAOLOZZI, R. J.; CASSU, R. N.; CRUZ, F. S et al. Diferentes doses de tramadol em cães: ações analgésicas, sedativas e sobre o sistema cardiorrespiratório. *Ciência Rural*, 41, p.1417-1423, 2011.

PARTATA, W. A; KREPSKY, A. M.; XAVIER, L. et al. Substance P immunoreactivity in the lumbar spinal cord of the turtle *Trachemys dorbigni* following peripheral nerve injury. *Brazilian Journal Medicine Biology Research*, v.36, p. 515–20, 2003.

PAUL-MURPHY, J.; ROBERTSON, S. A.; GAYNOR, J. A.; HELLYER, P. W.; WONG, P. L. The need for a cross-species approach to the study of pain in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, n. 5, p. 692-697, 2004.

- PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico São Paulo*, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.
- PERRY, S. M.; NEVAREZ, J. G. Pain and its control in reptiles. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, v.21, n.1, p. 1-16, 2018.
- PLIEGO, C. M.; BRUNO, S. F.; GONÇALVES, F. M. et al. Surgical treatment of paraphimosis in common Teiu. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 8, n. 4, p. 303-308, 2007.
- PORTENOY, R. K.; BRUNS, D.; SHOEMAKER, B. et al. Breakthrough pain in community-dwelling patients with cancer pain and noncancer pain, part 1: prevalence and characteristics. *J Opioid Manag*, v.6, n.2, p. 97-108, 2010.
- POSNER, L. P.; CHINNADURAI, S. K. Recognition and treatment of pain in reptiles, amphibians, and fish. *Pain management in veterinary practice*, p. 417-423, 2013.
- PYPENDOP, B. H.; ILKIW, J. E. Pharmacokinetics of tramadol, and its metabolite O-desmethyl-tramadol, in cats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 31, n. 1, p. 52-59, 2008.
- PYRON, R.A. A Taxonomic Revision of Boas (Serpentes: Boidae). *Zootaxa*, n. 2, p. 249-260, 2014.
- QUADRINI, A. E. et al. Haematological reference of snakes: Amazon tree boa (*Corallus hortulanus*, Linnaeus, 1758) and Burmese Python (*Python bivittatus*, Kuhl, 1820) in captive. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, p. 1172-1178, 2018.
- READ, M. R. Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, n. 4, p. 547-552, 2004.
- REECE, W. Fluidos corpóreos e o sangue. In: DUKES, H. *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 15-60.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. et al. validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.
- RIGUEIRA F.D.L., FONSECA N.M., LIMA A.P., et al. Efeitos do tramadol na extensão cranial e no tempo de bloqueio motor e sensitivo da anestesia epidural com lidocaína em cadelas. *Vet. Not.*, v.14, p. 29-35. 2008.

RYDLEWSKI, A. A.; PIZZO, J. S.; MANIN, L. P. et al. Métodos analíticos utilizados para a determinação de lipídios em leite humano: uma revisão. *Revista Virtual de Química*, v.12, n.1, 2020.

SBH. Brazilian Reptiles List of species. Acessado em 23 de outubro de 2022.
<http://www.sbherpetologia.org.br>.

SCOTT, L.J.; PERRY, M.P. 2000. Tramadol: a review of its use in perioperative pain. *Drugs*, v.60, pag. 139-176.

SERINELLI, I.; SOLOPERTO, S.; LAI, O. R. Pain and Pain Management in Sea Turtle and Herpetological Medicine: State of the Art. *Animals*, v.12, n.6, p. 697, 2022.

SHINE, R. Reptiles. *Current Biology*, v.23, n.6, p. 227-231.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, v.142, n.2-3, p.75-100, 2004.

SLADKY, K. K.; MANS, C. Clinical anesthesia in reptiles. *Journal of exotic pet medicine*, v. 21, n. 1, p. 17-31, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCHR, J. L. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCHR, J. L. (2Ed). Practical HPLC method development. New York: John Wiley & Sons, 1997, p. 600.

SOMOGYI, A. A.; BARRATT, D.; COLLER, J. K. Pharmacogenetics of Opioids. *Clinical pharmacology and therapeutic*, 81, p. 429-444, 2007.

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

SOUZA, M. J.; MARTIN-JIMENEZ, T.; JONES, M. P. Pharmacokinetics of intravenous and oral tramadol in the bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v.23, n.4, p. 247-252, 2009.

STEWART, A. J. et al. Pharmacokinetics of tramadol and metabolites Odesmethyltramadol and N-desmethyltramadol in Adult Horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 72, n. 7, p. 967-974, 2011.

TING, A. K.; TAY, V. S.; CHNG, H. T. et al. A Critical Review on the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Opioid Drugs Used in Reptiles. *Veterinary and Animal Science*, v.17, 2022.

UETZ, P.; HOŠEK, J. The Reptile Database, 2020. Acessado em 17 de outubro de 2022. www.reptile-database.org.

UNITED STATES. Department of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2001.

URSO, R.; BLARDI, P.; GIORGI, G. A short introduction to pharmacokinetics. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 6, p. 33–44, 2002.

VAN DE MERBEL, N., SAVOIE, N., YADAV, M. et al. Stability: recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *The AAPS Journal*, 16, p. 392-399, 2014.

VETTORATO, E.; ZONCA, A.; ISOLA, M. et al. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. *Vet J*, v.183, p. 310- 315, 2010.

VIANA, P. F. Evolução cromossômica em serpentes Neotropicais: uma abordagem comparativa. 2020. 172f Tese. Doutorado Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid receptors. *Annual review of biochemistry*, v. 73, n. 1, p. 953-990, 2004.

WHITTEM, T.; BETHS, T.; BAUQUIER, S. Farmacologia geral dos agentes anestésicos e analgésicos. In: LUMB & JONES. (5ªEd). Anestesiologia e analgesia em veterinária. Rio de Janeiro: Roca, 2017. p. 442-525.

WILLIAMS, H. J. Tramadol hydrochloride: something new in oral analgesic therapy. *Current Therapeutic Research*, v.58, n.4, p. 215-226, 1997.

WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product alalysis: The detection issue. *Planta Med*, n. 75, p. 719–734, 2009.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation*, v.120, n.11, p. 3742–3744, 2010.

XIA, Y.; HADDAD, G. G. Major difference in the expression of δ -and μ -opioid receptors between turtle and rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, v. 436, n. 2, p. 202-210, 2001.

YANG, C; WANG, J; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 799, n. 17, p. 8-22, 2013.

CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TRAMADOL E DO METABÓLITO O-DESMETILTRAMADOL EM PLASMA DE JIBOIAS

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do método analítico é um processo sistemático constituído de várias etapas com o objetivo de estabelecer as condições necessárias para determinar a concentração de uma substância ou grupo de substâncias numa amostra. A primeira etapa do processo é a definição da técnica analítica seguida da otimização das condições experimentais e, a partir dessas condições, avaliar estatisticamente se são adequadas ao propósito por meio da validação do método (Peres, 2002; Lanças, 2009).

Na definição do método analítico, várias técnicas podem ser utilizadas, porém a técnica de cromatografia é o método mais indicado para a separação de substâncias numa mistura biológica devido à alta especificidade e seletividade da técnica, já que é capaz de distinguir diferentes moléculas com base em suas características físico-químicas; alta sensibilidade, pois consegue separar e detectar pequenas quantidades de substâncias em matrizes diversas; e, ainda, é automática permitindo a separação de grandes quantidades de amostras (Peres, 2002; Ribani et al., 2004; Lanças, 2009).

O pré-tratamento tem como objetivo evitar danos aos equipamentos e respeitar aos critérios analíticos. O pré-tratamento das amostras, por exemplo, utiliza de diversas técnicas, sendo que as principais são: a precipitação de proteínas, extração líquido-líquido (LLE- Liquid-liquid Extraction) e a extração em fase sólida (SPE - Solid Phase Extraction) (Chao et al., 2000; Ribani et al., 2004; Jardim, 2010; Andrade-Eiroa et al., 2016; Niu et al., 2018).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou do inglês HPLC) tem uma vasta aplicabilidade devido a maior versatilidade, consegue separar diferentes compostos, incluindo substâncias polares e apolares de tamanhos variados; alta eficiência graças a alta pressão do sistema e colunas de alta resolução; maior velocidade quando comparado a outras técnicas, e ainda, pode ser utilizada para análise de opioides. Além disso, é uma das técnicas mais

confiáveis e amplamente utilizada em laboratórios de pesquisas acadêmicas a indústrias farmacêuticas e alimentícias (Chao et al.,2000; Peres, 2002; Maldaner et al., 2010; Giorgi et al., 2015).

O sistema de CLAE pode ser acoplado a vários tipos de detectores. O detector é importante para permitir a identificação e quantificação dos componentes separados na coluna, permitindo a determinação da concentração de cada substância de estudo (Degani et al., 1998; Peres, 2002; Lanças, 2009). O detector de fluorescência, por exemplo, é um detector com alta sensibilidade, permitindo a detecção de compostos em baixas concentrações. É um aparelho menos oneroso se comparado a espectrometria de massas, útil para compostos que têm a capacidade de fluorescer ou quando se é possível derivatizá-los para fluorescer, oferece sensibilidade extremamente alta, permitindo a detecção de compostos em níveis de partes por bilhão (ppb) ou até menos (Kukanich e Papich, 2004; Giorgi et al.,2015).

A validação de métodos cromatográficos pode ser realizada pelos parâmetros de desempenho analítico: a seletividade, a linearidade, a precisão, a exatidão, o limite de quantificação, robustez e a estabilidade garantindo que o método proposto é específico, linear, preciso para a finalidade a que se destina (Ribani et al., 2004; Peters et al., 2007; Inmetro, 2011). O uso de padrão interno (Pi) é indicado para minimizar os erros que afetam a precisão e a exatidão do método, conferindo maior confiança nos resultados obtidos (Lemos et al., 2000)

Atualmente, muitos dos métodos analíticos existentes para determinação do tramadol são otimizados para mamíferos, particularmente humanos. Os répteis têm uma fisiologia e metabolismo fundamentalmente diferentes, e quantificar tramadol em seu plasma preenche uma lacuna de conhecimento significativa. Com um método robusto e confiável, pode-se determinar a farmacocinética do tramadol em serpentes. Isso nos permite entender melhor como esse analgésico é biotransformado, distribuído, excretado e, mais importante, qual é sua meia-vida nesses animais, sendo fundamental para determinar dosagens seguras e eficazes. Portanto, este estudo pode ser útil para o desenvolvimento de métodos similares para outros compostos ou metabólitos de interesse em répteis, ampliando ainda mais o escopo da pesquisa e aplicações clínicas.

Sendo assim, este trabalho não apenas apresenta uma técnica inovadora e específica para serpentes, mas desenvolve, otimiza e valida um método analítico para determinação de tramadol e do metabólito O-desmetiltramadol (M1) em plasma de jiboias, a partir dos recursos disponíveis no Laboratório de Controle de Qualidade da Escola de Farmácia,.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 171/2021, cadastrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen número A5BCF84, autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO número 78843-1 e pelos proprietários do criatório Jiboias Brasil, criatório licenciado pelo IBAMA/IEF.

2.1 Infraestrutura

A coleta de sangue foi realizada no criatório licenciado pelo IBAMA/IEF denominado Jiboias Brasil, localizado na região metropolitana de Belo Horizonte, na cidade de Betim, bairro Parque Betim Industrial.

As etapas de desenvolvimento e validação do método (tramadol e M1) foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2 Animais

Foram selecionadas 10 jiboias (*Boa constrictor constrictor*) sadias, machos, reprodutores, pesando ($4,33 \pm 1,5\text{Kg}$), com bom score corporal, provenientes do criatório Jiboias Brasil. Como critério de inclusão no estudo os animais foram atestados saudáveis através do exame físico e exames complementares (hemograma e bioquímico)

Foi realizado um estudo piloto para a definição do local de injeção do fármaco, punção de sangue, ajustes no tempo de coleta e observações prévias ao experimento. O tempo de coleta foi baseado em trabalhos descritos na literatura com algumas modificações e a definição do local de punção foi definida na veia paravertebral (Olsson e Simpson, 2017). Além disso, o piloto possibilitou testes laboratoriais para determinação da fase móvel e do Pi. No laboratório, diversas substâncias, tais como o sotalol, fluconazol e a metoclopramida foram testadas como Pi e diferentes composições de fase móvel (Giorgi et al., 2015; Bunke et al., 2017; Bisetto et al., 2018) até que fossem encontradas condições ideais.

Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo observador e estavam em concordância com os membros participantes do projeto. A manipulação dos animais também foi realizada pelos mesmos membros, a fim de evitar um maior efeito estressor

Os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais de tamanhos: 63,1 x 44,1 x 33,1 cm com capacidade de 68 litros, com pequenos furos para circulação de ar, com substrato de papel toalha, trocadas sempre que necessário. O fornecimento de água era realizado através de potes plásticos (bebedouros desenvolvidos para cães) *ad libitum*. Essas caixas plásticas eram identificadas com os nomes dos animais.

Antes da experimentação, as serpentes eram transferidas e mantidas em sala arejada, destinada a experimentação e com temperatura monitorada, mantida na faixa ótima para a espécie (entre 28 e 30°C). Também foi preconizado o mesmo período do dia para realização das coletas de sangue do experimento, através de punção aspirativa com seringa estéril de 3ml acoplada a agulha hipodérmica 0,70 x 25mm. Iniciando-se sempre as 6h da manhã. O tempo de *washout* foi de 45 dias para que a serpente fosse novamente testada (Giorgi et al., 2015). Foi realizado estudo do tipo crossover 10 x 2, em que os animais recebiam tratamento de tramadol por via intramuscular primeiro e depois de 45 dias da aplicação, os mesmos 10 animais recebiam o tratamento por via intravenosa, em administração única.

2.3 Delineamento experimental

O presente trabalho foi dividido em duas fases de execução:

- Fase 1: Coleta de amostras de sangue dos animais
- Fase 2: Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação da biodisponibilidade de tramadol e do metabólito o-desmetiltramadol em plasma de jiboias.

2.3.1 Fase 1

Os animais foram definidos por sorteio aleatório dentro de um grupo pré-estabelecido pelo criatório. As doses foram definidas a partir de estudos sobre o tramadol em outras espécies (Giorgi et al., 2015; Gris., 2018). Todos os animais eram machos em idade reprodutiva e que haviam se alimentado a duas semanas antes do início do experimento. Após o sorteio o animal recebia o tratamento 1 e depois de 45 dias o tratamento 2.

- Tratamento 1-TRIM (tramadol 5mg.kg⁻¹ IM): O animal sorteado recebeu 5mg.kg⁻¹ de tramadol na musculatura epaxial no final do terço cranial.
- Tratamento 2 -TRIV (tramadol 5mg.kg⁻¹ IV): O animal sorteado recebeu 5mg.kg⁻¹ de tramadol na veia paravertebral no final do terço cranial.

No dia do experimento, o animal era contido para pesagem individual e, em seguida, era aplicado o tratamento utilizando seringa estéril de 1ml acoplada a agulha hipodérmica 0,7 x 25mm mediante prévia antissepsia com gaze umedecida em álcool 70°. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue nos tempos indicados conforme demonstrado na Tabela 4.

Para animais do tratamento TRIM e para os animais do tratamento TRIV, foram coletadas amostras de sangue em 10 tempos, sendo o tempo 0 (antes da administração), tempo1 (vinte minutos após administração do tramadol); tempo 2 (quarenta minutos após); tempo 3 (uma hora após) tempo 4 (cento e vinte minutos após) T5 (duzentos e quarenta minutos após); T6

(quatrocentos e oitenta minutos após); T7 (setecentos e vinte minutos após); T8 (mil e oitenta minutos após) e T9 (mil quinhentos e sessenta minutos após) como pode ser observado na Tabela 4. Após esse período experimental a serpente voltava a rotina de origem no criatório Jiboias Brasil. Foram padronizados os locais de aplicação do tramadol, sendo escolhido o final do terço cranial do animal, já o local de coleta de sangue foi realizado no início do terço caudal dos animais.

O sangue coletado (aproximadamente 1,5 mL de sangue em cada tempo), no terço caudal da serpente utilizando agulha hipodérmica 0,7x 25mm, foram colocados em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Em seguida, eles foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (plasma) foi armazenado em tubos de plásticos e congelados a -70°C para utilização na fase 2 do experimento. As descrições dos tempos com as respectivas coletas de sangue estão demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4. Procedimento experimental, coleta de sangue e observações (adaptado de Giorgi et al., 2015; Bunke et al., 2017; Bisetto et al., 2018).

TEMPO	MINUTOS	PROCEDIMENTO
T0	antes da injeção de tramadol	Coleta de sangue (SG)
T1	20min	Coleta de sangue (SG)
T2	40min	Coleta de sangue (SG)
T3	60min	Coleta de sangue (SG)
T4	120min	Coleta de sangue (SG)
T5	240min	Coleta de sangue (SG)
T6	480min	Coleta de sangue (SG)
T7	720min	Coleta de sangue (SG)
T8	1080min	Coleta de sangue (SG)
T9	1560min	Coleta de sangue (SG)

* Total de sangue coletado ao final do experimento até 1% do peso vivo

2.3.2 Fase 2

2.3.2.1 Condições cromatográficas definidas

A fase móvel (FM) foi preparada a partir de uma solução de 0,01M de fosfato de sódio dibásico anidro¹ e trietilamina² 0,1% (v/v) acidificada com ácido fosfórico³. Empregou-se um pH de 2,9. Para isso, foi pesado 1,419g de fosfato de sódio dibásico anidro, depois transferido para um becker e acrescentado 1,0 litro de água ultrapurificada. Para esse ser dissolvido, foi colocado no agitador⁴ durante 2 minutos. Adicionado 1,0 mL de trietilamina, e ajustado o pH com gotas de ácido fosfórico até o valor de 2,9 verificado com pHmetro⁵ (Kukanich e Papich, 2004).

Para a definição da composição da fase móvel e obtenção dos comprimentos de onda de excitação e emissão do tramadol, do M1 e do Pi, injetou-se, a amostra “branco” (sem o analito) em fase móvel (75:25); e solução de fase móvel com 10 µg/mL de tramadol, 2µg/mL de M1 e 6 µg/mL de ondansetrona.

As soluções-stock dos analitos em estudo (tramadol⁶ e M1⁷) e do Pi (ondansetrona⁸) foram preparadas em metanol (MeOH⁹). Conforme demonstrado a seguir e apresentado na Tabela 5.

Solução estoque padrão de tramadol (200 µg/mL): Foram pesados 2,0 mg de tramadol Padrão primário, transferido para balão volumétrico de 10mL e solubilizado em metanol (10mL), utilizando ultrassom¹⁰ para solubilização e obtendo a concentração de 200 µg/mL. Em seguida,

¹ Fosfato de sódio dibásico anidro, Neon, São Paulo, SP, Brasil

² Trietilamina PA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA

³ Ácido fosfórico PA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA

⁴ Agitador tipo vórtex FANEM, modelo 258

⁵ PHmetro Micronal, modelo B 474

⁶ O- desmetiltramadol, Sigmaaldrich, Missouri, (USA)

⁷ Tramadol Hydrochloride, padrão analítico, Sigma Aldrich, St Louis, (USA)

⁸ Ondansetrona Hydrochloride, padrão analítico, Sigma Aldrich, (USA);

⁹ Metanol grau cromatográfico Merck

¹⁰ Banho ultrassônico Unique, modelo USC-1400

realizado armazenamento em congelador ($T = -20^{\circ} \text{C}$), com validade de 6 meses conforme Ribani et al.(2004).

Solução trabalho de tramadol ($10 \mu\text{g/mL}$): Foram transferidos $500 \mu\text{L}$ da solução estoque para um balão volumétrico de 10mL e completado com 10mL de metanol, utilizando ultrassom para solubilização e obtendo a concentração de $10\mu\text{g/mL}$. Em seguida, realizado armazenamento em geladeira ($T = 2-8^{\circ} \text{C}$), com validade de até três semanas (Ribani et al., 2004).

Solução estoque de M1($100\mu\text{g/mL}$): Uma ampola contendo 1mg/mL foi transferida para um balão volumétrico de 10mL e solubilizado em metanol.

Solução trabalho de M1 ($5\mu\text{g/mL}$): Foram pipetados $500 \mu\text{L}$ da solução estoque e transferido para um balão volumétrico de 10mL e completado com 10mL de metanol, obtendo a concentração final.

Solução estoque padrão de ondansetrona ($200 \mu\text{g/mL}$): Foi realizado a dissolução do pó. Para isso, foram pesados $2,0 \text{mg}$ de ondansetrona, transferido para balão volumétrico de 10mL e solubilizado em metanol (10mL) utilizando ultrassom de modo a obter solução a concentração final de $200 \mu\text{g/mL}$. Em seguida, realizado armazenamento ($T = -20^{\circ} \text{C}$) em congelador, com validade de 6 meses conforme Ribani et al. (2004).

Tabela 5. Soluções diluídas para construção de soluções trabalho dos analitos

Substância	Concentração sol. estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração sol. padrão trabalho ($\mu\text{g/mL}$)
TRAMADOL	200	10
ONDANSETRONA	200	200
O-DESMETILTRAMADOL (M1)	100	5

Foi definido a ondansetrona como padrão interno (Pi) e foi utilizada a coluna Phenyl-2 Hypersil com 150mm de comprimento, $4,6 \text{mm}$ de diâmetro e partículas com $5\mu\text{m}$ de diâmetro da Thermo Scientific.

Foi utilizado um cromatógrafo que permite detecção em 2 comprimentos de ondas diferentes. Para obtenção do método analítico utilizamos um comprimento de onda de excitação de 202

nm para o tramadol e para o M1. E comprimento de onda de excitação para a ondansetrona de 305 nm. Já os comprimentos de onda de emissão para tramadol e M1 foram de 296 nm e para ondansetrona 365 nm.

Empregou-se vazão de fase móvel de 1mL/min e volume de injeção de 20 µL. A fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose¹¹, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm e degaseificadas em banho ultrassônico por vinte minutos. Estas condições cromatográficas estão demonstradas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições cromatográficas do método analítico por CLAE-FL¹²

CONDIÇÃO	DESCRIÇÃO
COLUNA ANALÍTICA	Phenyl-2 Hypersil (150x4,6mm, 5µm)
COMPOSIÇÃO DA FM	0,01 M fosfato de sódio dibásico anidro:Acetonitrila ¹³ (75:25 v/v) 0,1% trietilamina (v/v) Ácido fosfórico (pH2,9)
VAZÃO DA FM	1ml/min
MODO DE ELUIÇÃO	Isocrático
TEMPERATURA(T°)	40°
VOLUME DE INJEÇÃO	20µl
DETECÇÃO	202 Comprimento de onda de excitação do tramadol 305 Comprimento de onda de excitação da ondansetrona 296 Comprimento de onda de emissão do tramadol 365 Comprimento de onda de emissão da ondansetrona 202 Comprimento de onda de excitação do M1 296 Comprimento de onda de emissão do M1
PICOS	Tramadol 6minutos Ondansetrona 9 minutos M1 3 minutos

¹¹ MILLIPORE

¹² Waters, modelo 2695

¹³ Acetonitrila grau CLAE Tedia Company Inc., Fairfield, EUA

2.3.2.2 Preparo das amostras

Para iniciar as análises, as amostras de plasma branco (sem o analito) foram descongeladas e deixadas na bancada até atingirem a temperatura ambiente. Foi utilizada a técnica de extração de proteínas para o preparo dos pontos da curva de calibração.

2.3.2.2.1 Preparo dos pontos da curva de calibração

Para a simulação da matriz de análise procedeu-se da seguinte forma: uma solução de 30 µL de padrão interno foi colocada em cada tubo de vidro, 6 tubos de 10 mL e evaporado até a secura em banho de água a 40°C, sob fluxo de ar comprimido. Em seguida foram adicionadas quantidades adequadas de solução padrão trabalho, de modo a obter a faixa de concentrações utilizadas no presente estudo: para o tramadol (0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 µg/mL); e para o M1(0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 µg/mL), conforme demonstrado na Tabela 7 e 8.

Aos tubos foram adicionados 500 µL de pool de plasma branco. Após as adições, foi agitado em vórtex por 1 minuto e adicionado 2,0 mL de acetonitrila com posterior agitação em vórtex por mais 1 minuto. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e apenas o sobrenadante obtido foi transferido para outros tubos de 10 mL. Então, a solução foi evaporada a 40°C sob fluxo de ar comprimido até a secura. O resíduo final foi ressuscitado novamente com 500 µL fase móvel e agitado no vórtex por 1 minuto. Em seguida foi filtrado, com filtro de seringa, transferido para vial e analisado por CLAE-FL.

Tabela 7. Soluções diluídas para construção de curva de calibração de tramadol

Concentração trabalho de tramadol µg/mL	Volume de solução pipetada tramadol (µL)	Plasma (mL)	Pontos da curva µg/mL
10	5,0	0,5	0,1
10	10,0	0,5	0,2
10	50,0	0,5	1
10	100,0	0,5	2
10	200,0	0,5	4
10	300,0	0,5	6

Tabela 8. Soluções diluídas para construção de curva de calibração do M1

Concentração trabalho M1 µg/mL	Volume de solução pipetada M1 (µL)	plasma (mL)	Pontos curva µg/mL	da
5	5,0	0,5	0,05	
5	10,0	0,5	0,1	
5	20,0	0,5	0,2	
5	50,0	0,5	0,5	
5	100,0	0,5	1	
5	200,0	0,5	2	

2.3.2.3 Extração de proteínas das amostras experimentais

Para a extração de proteínas, uma solução de 30 µL de padrão interno foi colocada em cada tubo de vidro, 10 tubos de 10 mL. E em seguida, evaporada até os tubos ficarem secos a uma temperatura de 40°C sob fluxo de ar comprimido desumidificado, após isso adicionou-se 500 µL de plasma no respectivo tempo de coleta. Após as adições foi agitado em vórtex por 1 minuto e adicionado 2,0 mL de acetonitrila com posterior agitação em vórtex por mais 1 minuto. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm e apenas o sobrenadante obtido foi transferido para outros tubos de 10 mL. Então, este líquido foi evaporado em banho de água a 40°C, sob fluxo de ar comprimido até a secura. O resíduo final foi ressuscitado novamente com 500 µL fase móvel e agitado no vórtex por 1 minuto. Em seguida foi filtrado, com filtro de seringa, transferido para vial e analisado por CLAE-FL.

2.3.2.4 Parâmetros de validação do método

A adequação do sistema cromatográfico foi avaliada por meio de injeção, em quintuplicata, de uma solução metanólica com 10,6µg/mL de tramadol, 5,0 µg/mL de M1 e 200,0 µg/mL do Pi. A área relativa média de cada concentração (DPR- área sob os picos de cada analito pela área do padrão interno), foram analisados.

A padronização interna foi realizada, adicionando uma quantidade constante de pi conhecida as amostras “branco” e “experimentais”, a fim de ser capaz de corrigir erros relacionadas as perdas do analito de interesse.

O método bioanalítico foi validado parcialmente de acordo com as recomendações da Resolução RDC n°27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA (Brasil, 2012) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da European Medicines Agency (EMA), (EMA, 2011). Os parâmetros estudados foram a seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade curta dos analitos na matriz biológica. A determinação destes parâmetros assegura que o método produz resultados confiáveis. Os dados foram analisados com o auxílio dos softwares Microsoft Excel®.

2.3.2.4.1 Seletividade

No presente estudo, a seletividade do método foi avaliada mediante a comparação dos cromatogramas do “branco” (plasma sem analito) com os cromatogramas de uma solução metanólica com 10,6 µg/mL de tramadol, 5,0 µg/mL de M1 e 200 µg/mL de Pi. Os cromatogramas foram obtidos por meio de injeção em triplicata dessas amostras.

2.3.2.4.2 Linearidade

Para o estudo da linearidade, amostras de “pool” de plasma branco (plasma sem analito) foram fortificadas com quantidades conhecidas de tramadol, M1 e de ondansetrona, para se obter uma faixa de concentrações de tramadol de (0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 µg/mL), e uma faixa de concentração de M1 (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 µg/mL) e uma faixa de concentração de ondansetrona nas respectivas concentrações do analito em estudo. Dessa forma, foram preparadas 6 soluções de tramadol, de M1 e de ondansetrona, provenientes da diluição a partir de uma solução padrão trabalho para cada nível de concentração. A preparação dos pontos da curva de calibração foi realizada diariamente.

A partir desta preparação e injeção, a linearidade foi obtida calculando a regressão linear (razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno versus a concentração da curva) e o respectivo coeficiente de determinação (R^2) de três curvas de calibração independentes, obtidas de seis padrões diferentes para tramadol (0,1; 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 µg/mL) e para M1 (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 µg/mL). O respectivo coeficiente de determinação final obtido foi calculado pela média das três curvas.

2.3.2.4.3 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção e de quantificação foram determinados pela análise da menor concentração do analito capaz de serem detectadas e quantificadas com precisão exatidão aceitáveis.

2.3.2.4.4 Precisão

2.3.2.4.4.1 Precisão intra-dia do método CLAF-FL

A precisão intra-dia foi calculada no mesmo dia da análise, analisando 6 vezes o mesmo padrão para três concentrações diferentes de tramadol (0,1; 2,5; 5,0 µg/mL) e M1 (0,05; 0,8; 1,8 µg/mL), calculando o coeficiente de variação para os dados obtidos (CV% intra-dia).

2.3.2.4.4.2 Precisão inter-dia do método CLAF-FL

A precisão inter-dia foi calculada em dois dias diferentes, extraindo 12 padrões distintos para três concentrações diferentes tramadol (0,1; 2,5; 5,0 µg/mL) e M1 (0,05; 0,8; 1,8 µg/mL) e calculando o respectivo coeficiente de variação para os dados obtidos (CV% inter-dia).

2.3.2.4.5 Estabilidade

2.3.2.4.5.1 Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), mantidas à temperatura ambiente durante 8 horas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas.

2.3.2.4.5.2 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a -20 °C por 24 horas, seguido de descongelamento à temperatura ambiente e posterior congelamento a -20 °C por 24 horas.

A concentração dos analitos nas amostras de padrão de controle de qualidade foi determinada após seu descongelamento e comparada aos resultados de amostras recém-preparadas.

3 RESULTADOS

3.1 Animais

Todos os animais eram hígidos avaliados através do exame clínico e laboratorial. Não foram observadas reações adversas à inspeção e o histórico alimentar permaneceu dentro da normalidade. Foi observado que no T9 do tratamento 2, 6 jiboias que receberam tramadol por via intravenosa, ficaram durante a captura e contenção mais tranquilizadas e demonstrando menor enrolar da cauda, do que quando foram submetidas ao tratamento TRIM.

3.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas para o método desenvolvido empregando a técnica de CLAE-FL estão apresentadas na Tabela 9.

A coluna fenil e a composição da fase móvel foi baseada num método previamente publicado (Kukanich e Papich, 2004), porém com modificações. A utilização do Pi, ondansetrona, foi inédita. Os tempos de retenção dos analitos de interesse foram 6,1 para o tramadol e 3,5 para M1. E do Pi foi de 8,9.

Tabela 9. Resumo final das condições cromatográficas do método analítico para determinação de Tramadol e metabólito M1 (O-desmetiltramadol) em plasma de jiboias por CLAE-FL.

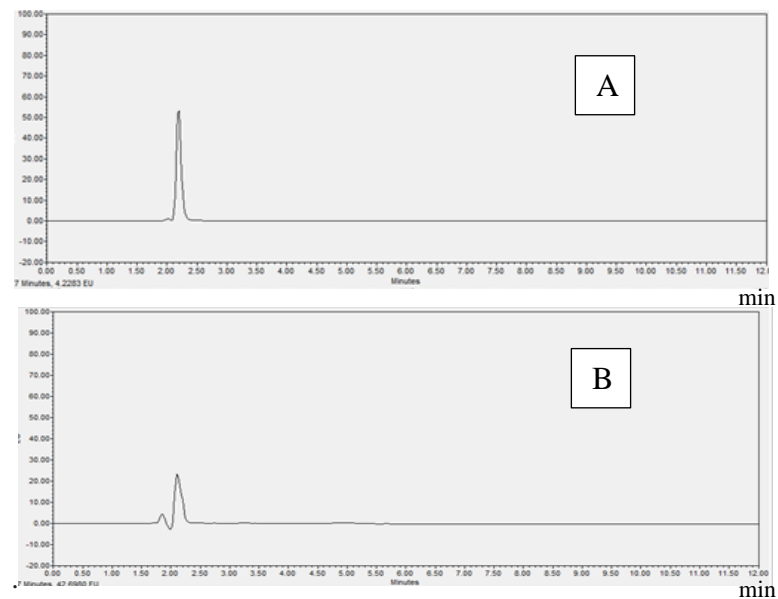
CONDIÇÃO	DESCRIÇÃO
COLUNA ANALÍTICA	Phenyl-2 Hypersil (150x4,6mm, 5µm)
COMPOSIÇÃO DA FM	0,01 M Dibásico Sodium phosphale dibasic anhydrous : Acetonitrila (75:25 v/v) 0,1% trietilamina (v/v) Ácido fosfórico (pH2,9)
VAZÃO DA FM	1,0 ml/min
MODO DE ELUIÇÃO	Isocrático
TEMPERATURA(T°)	40°
VOLUME DE INJEÇÃO	20µl
DETECCÃO	202 Comprimento de onda de excitação do tramadol 305 Comprimento de onda de excitação da ondansetrona 296 Comprimento de onda de emissão do tramadol 365 Comprimento de onda de emissão da ondansetrona 202 Comprimento de onda de excitação do M1 296 Comprimento de onda de emissão do M1
TEMPO DE RETENÇÃO	Tramadol 6,1 minutos Ondansetrona 8,9 minutos M1 3,5 minutos

3.3 Seletividade

Na figura 1 estão representados os cromatogramas das injeções da fase móvel (tampão: acetonitrila) nos comprimentos de ondas do tramadol (Ex. 202; Em. 296) e da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365). Na figura 2 estão representados os cromatogramas da extração de um branco nos comprimentos de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) e da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365). Na figura 3 estão representados os cromatogramas da injeção extração do plasma hemolisado branco nos comprimentos de onda do tramadol (296) e da ondansetrona(365). Na figura 4 estão representados os cromatogramas da injeção da solução de tramadol, de M1 e de

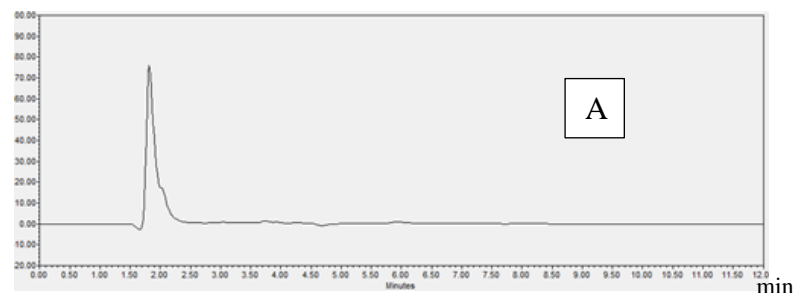
ondansetrona na concentração C1 da curva. Na figura 5 estão representados os cromatogramas da injeção da solução de tramadol e de M1 na concentração C6 da curva no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).

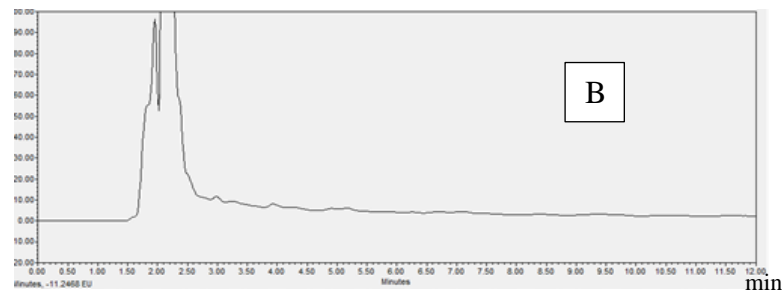
Figura 1. A- Cromatograma da injeção de fase móvel (tampão:acetonitrila) no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296); B- Cromatograma da injeção de fase móvel, pH 2,9 (tampão:acetonitrila) no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365).



Fonte: Elaborado pelo autor

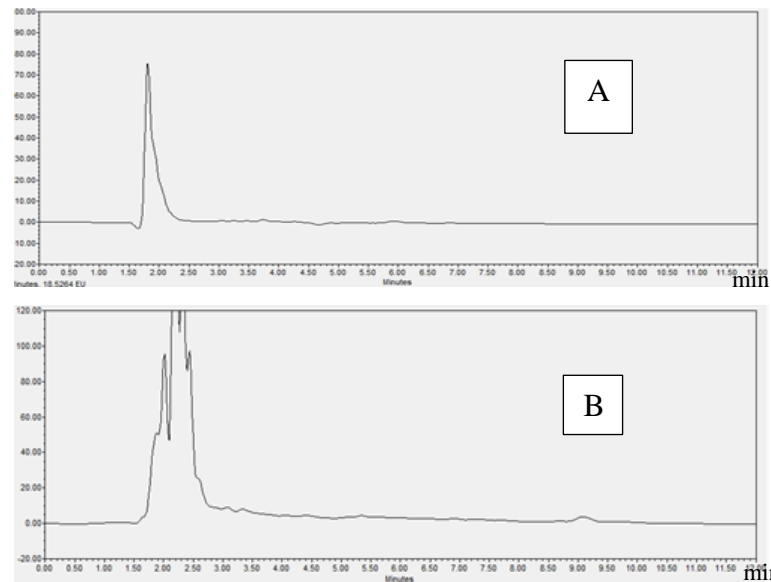
Figura 2. Cromatograma de amostra extraída de plasma branco de jiboias no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) (A) e no comprimento de onda da ondansetrona (B) (Ex. 305; Em. 365).





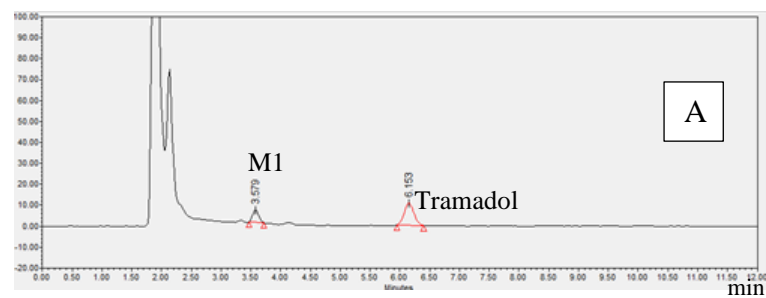
Fonte: Elaborado pelo autor

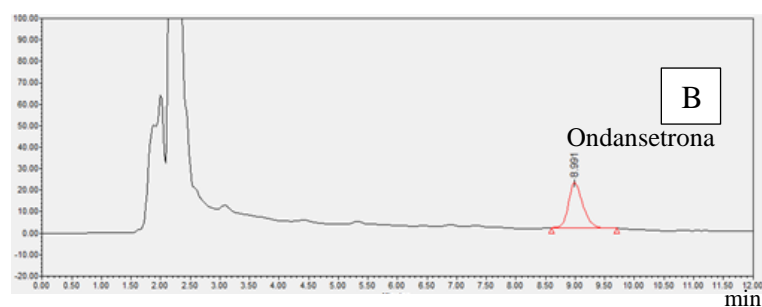
Figura 3. Cromatograma de amostra extraída de plasma hemolisado branco no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296)(A) e no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365) (B).



Fonte: Elaborado pelo autor

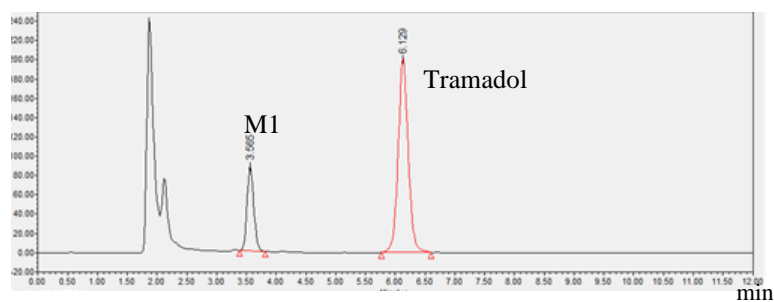
Figura 4. Cromatograma da injeção da solução de tramadol e de M1 na concentração C1 da curva, no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) (A). Cromatograma da injeção da solução de ondansetrona na concentração C1 da curva, no comprimento de onda da Ondansetrona (Ex. 305; Em. 365) (B).





Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5. Cromatograma da injeção da solução de tramadol e de M1 na concentração C6 da curva, no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).



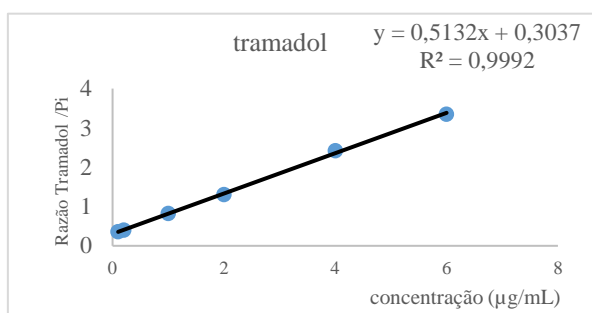
Fonte: Elaborado pelo autor

3.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela injeção em triplicata de soluções-padrão de tramadol e M1 em fase móvel. As curvas-médias ($n=3$) de linearidade para os métodos validados e os parâmetros dos gráficos estão representados nas Figuras 6 e 7.

Os cromatogramas sobrepostos são representativos das injeções da extração de plasma de jiboia enriquecidos com padrão de tramadol e M1 em todas as concentrações na curva de calibração para avaliação da linearidade do método no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296), representada na figura 8.

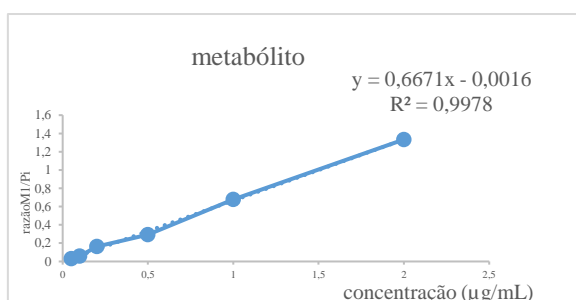
Figura 6. Curva analítica média e parâmetros referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de tramadol em plasma de jiboias proveniente do desenvolvimento de método empregando-se a técnica CLAE-FL. Cada ponto representa a média de três determinações.



Fonte: elaborado pelo autor

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,5132
Coeficiente linear(b)	0,3037
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9992

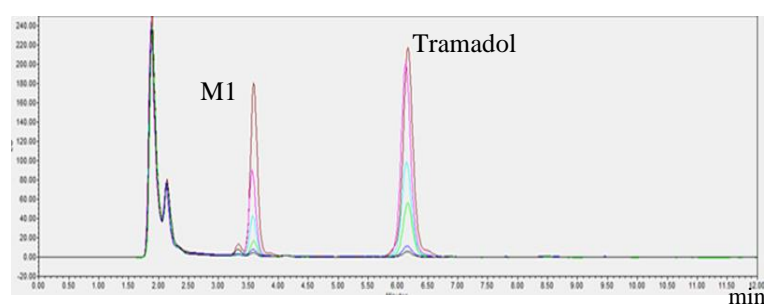
Figura 7. Curva analítica média e parâmetros referente ao método analítico desenvolvido para quantificação de M1 em plasma de jiboias proveniente do desenvolvimento de método empregando-se a técnica CLAE-FL. Cada ponto representa a média de três determinações.



Fonte: Elaborado pelo autor

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,6671
Coeficiente linear(b)	-0,0016
Coeficiente de determinação (R ²)	0,9978

Figura 8. Cromatogramas sobrepostos são representativos das injeções da extração de plasma de jiboia enriquecidos com padrão de tramadol e M1 em todas as concentrações na curva de calibração para avaliação da linearidade do método no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).



Fonte: Elaborado pelo autor

3.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas em dois níveis: intra-dia e inter-dias (2 dias consecutivos), sendo ambas avaliadas pela análise dos resultados obtidos das injeções de soluções-padrão previamente descritas nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Precisão e exatidão calculadas a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos(inter-dia) para o tramadol utilizando CLAE-FL.

Tramadol ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV(%)		Exatidão (%) Desvio médio em relação ao valor real	
	Intra-dia n=6	Inter-dia n=12	Intra-dia n=6	Inter-dia n=12
CQB – 0,1	9,11	8,56	+3,31	+5,23
CQM – 2,5	2,05	4,25	+0,35	+3,89
CQA – 5,0	0,56	5,87	+0,87	+2,63

Tabela 11. Precisão e exatidão calculadas a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos(inter-dia) para o M1 utilizando CLAE-FL.

M1 ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV(%)		Exatidão (%) Desvio médio em relação ao valor real	
	Intra-dia n=6	Inter-dia n=12	Intra-dia n=6	Inter-dia n=12
CQB – 0,05	6,85	3,84	+7,85	+4,51
CQM – 0,8	1,94	2,48	+3,5	+2,21
CQA – 1,8	3,67	5,35	+0,69	+1,84

3.6 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção foi de $0,03\mu\text{g/mL}$ para o tramadol e $0,03\mu\text{g/mL}$ para o M1. O limite de quantificação foi pela análise de repetidas injeções da primeira concentração da curva de calibração apresentando exatidão e precisão aceitáveis, sendo, portanto, de $0,1\mu\text{g/mL}$ para o tramadol e $0,05\mu\text{g/mL}$ para o M1.

3.7 Estabilidade dos analitos

3.7.1 Estabilidade de curta duração

Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração das amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) de tramadol e M1 em fase móvel mantidas à temperatura ambiente por 8 horas estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

3.7.2 Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento

Nas Tabelas 14 e 15 encontram-se os resultados da avaliação da estabilidade das amostras de controle de qualidade de tramadol e M1 após ciclos de congelamento e descongelamento obtidos pela comparação dos resultados das soluções congeladas a -20 °C por 24 horas com amostras recém-preparadas.

Tabela 12. Estabilidade de curta duração do tramadol em fase móvel após 8 horas em temperatura ambiente (t° ambiente). Resultados apresentam a média de seis determinações.

Tramadol ($\mu\text{g/mL}$)	Amostras recém preparadas			Amostras em t° ambiente por 8h			
	Concentração determinada	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio*
CQB- 0,10	0,148	9,11	3,31	0,146	5,71	4,12	-1,35
CQM- 2,5	2,46	2,0	0,35	2,42	3,54	6,87	-1,62
CQA- 5,0	4,87	4,21	0,87	4,86	2,65	6,4	-0,20

*Desvio em relação a amostra recém preparada

Tabela 13. Estabilidade de curta duração do M1 em fase móvel após 8 horas em temperatura ambiente (t°ambiente). Resultados apresentam a média de seis determinações.

M1 (µg/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras em t° ambiente por 8h			
	Concentração determinada	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio *
CQB-0,05	0,048	6,856	3,84	0,047	6,510	6,40	-2,5
CQM-0,8	0,804	1,945	2,48	0,801	4,950	6,85	-0,373
CQA-1,8	1,741	3,675	5,35	1,680	3,710	2,64	-3,504

*Desvio em relação a amostra recém preparada

Tabela 14. Estabilidade do tramadol no plasma após 24 horas de congelamento a -20 °C. Resultados apresentam a média de seis determinações.

Tramadol (µg/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras descongeladas após 24h de congelamento			
	Concentração determinada	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio*
CQB-0,10	0,103	9,11	3,31	0,107	6,32	3,45	- 0,675
CQM-2,5	2,46	2,0	0,35	2,34	8,64	5,48	- 4,87
CQA-5	4,87	4,21	0,87	4,68	3,96	6,48	- 3,90

*Desvio em relação a amostra recém preparada

Tabela 15. Estabilidade do M1 no plasma após 24 horas de congelamento a -20 °C. Resultados apresentam a média de seis determinações.

M1 (µg/mL)	Amostras recém preparadas			Amostras descongeladas após 24h de congelamento			
	Concentração determinada	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Concentração determinada (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio *
CQB-0,05	0,048	6,856	3,84	0,0451	8,12	4,32	- 6,04
CQM-0,8	0,804	1,945	2,48	0,741	4,51	5,64	- 7,83
CQA-1,8	1,741	3,675	5,35	1,745	6,78	3,45	- 0,23

*Desvio em relação a amostra recém preparada

3.8 Análise da extração

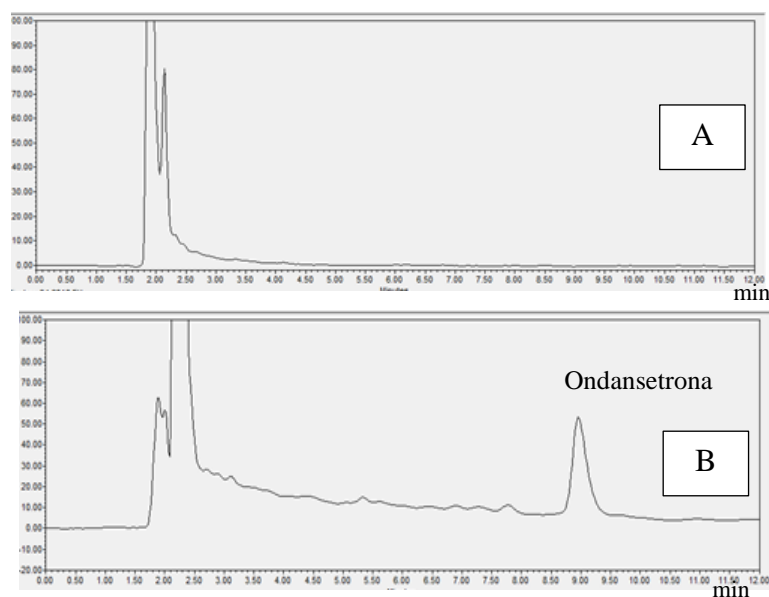
O M1, o tramadol e a ondansetrona foram detectados aproximadamente aos 3,5; 6,1 e 8,9 minutos. Os cromatogramas de amostra extraída de plasma de jiboias no T0 nos comprimentos de ondas do tramadol (Ex. 202; Em. 296) e da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365), respectivamente estão representados na figura 9.

O cromatograma de amostra extraída de plasma de jiboias no T2 pela via IV no comprimento de onda do tramadol e M1 (Ex. 202; Em. 296) está representado na figura 10.

Os cromatogramas de amostras de plasma de jiboias no T5 pela via IM no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) e no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365) estão representados na figura 11.

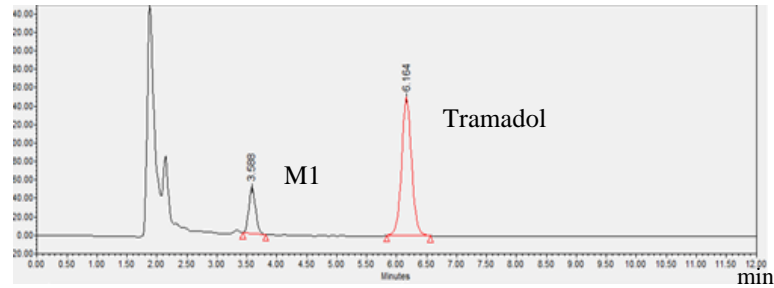
O cromatograma de amostras de plasma de jiboias no T9 pela via IM no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296) está representado na figura 12.

Figura 9. A- Cromatogramas de amostras extraídas do plasma de jiboias no T0 no comprimento de onda da tramadol (Ex. 202; Em. 296). B- Cromatogramas de amostras de plasma de jiboias no T0 no comprimento de onda ondansetrona (Ex. 305; Em. 365).



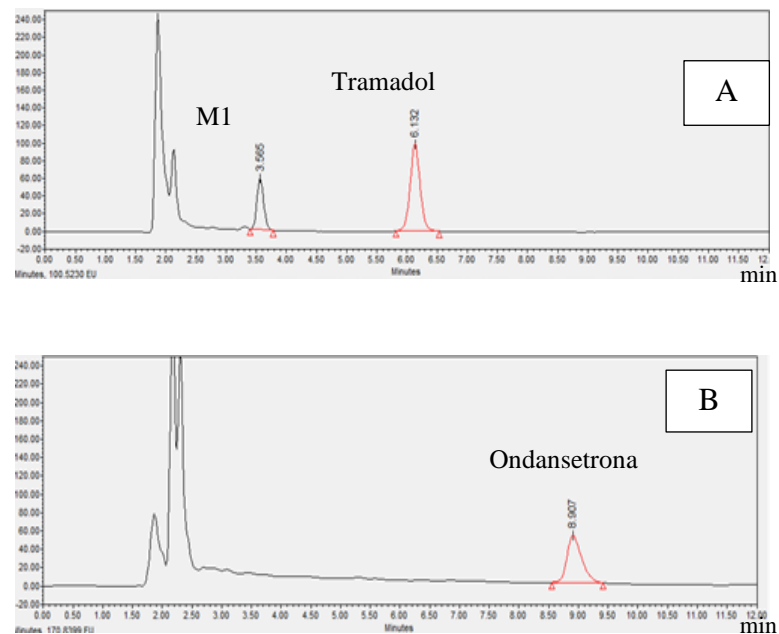
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10. Cromatogramas de amostras extraídas de plasma de jiboias no T2 pela via IV no comprimento de onda da tramadol (Ex. 202; Em. 296).



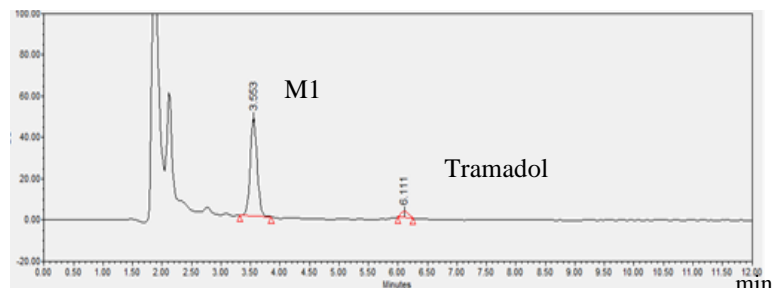
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11. A- Cromatogramas de amostra extraída de plasma de jiboias no T5 pela via IM no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296); B- no comprimento de onda da ondansetrona (Ex. 305; Em. 365).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12. Cromatogramas de amostras de plasma de jiboias no T9 pela via IM no comprimento de onda do tramadol (Ex. 202; Em. 296).



Fonte: Elaborado pelo autor

4 DISCUSSÃO

Este estudo realizou o desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico por CLAE-FL para determinação de tramadol e do metabólito O-desmetiltramadol em plasma de jiboias.

Este estudo é pioneiro em realizar esta metodologia em serpentes, utilizando o plasma de *Boa constrictor constrictor* como matriz biológica para desenvolvimento, otimização e validação por CLAE-FL.

Não foi observado efeito adverso ou algum óbito dos animais após a administração de tramadol na dose de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via IV ou IM em serpentes deste estudo. Os exames laboratoriais foram utilizados como critério de inclusão para atestar a higidez dos animais.

O presente estudo foi possível devido a parceria realizada com o Laboratório de Controle de Qualidade da Escola de Farmácia, que possibilitou o desenvolvimento, a validação e a execução do método.

A melhor coluna para o método foi a coluna fenil já que os picos dos analitos obtiveram melhor resolução, este fato deve-se provavelmente porque a coluna teve maior interação com os

analitos, apresentando um grupo mais polar compatível com as moléculas dos analitos (Maldaner et al.,2010).

Foram realizadas corridas cromatográficas no aparelho de CLAF-FL até que fossem definidas condições cromatográficas adequadas, para o método analítico. As características físico-químicas do tramadol e os fundamentos básicos da teoria de separação por CLAE foram considerados.

A preparação da fase móvel foi baseada através de revisão de literatura, a proporção de acetonitrila foi ajustada a partir das corridas cromatográficas até o ajuste que possibilitou otimizar a separação, sendo a proporção (75:25) adequada para o método. Na literatura, para o desenvolvimento do método para o tramadol, não foi relatada o uso desta proporção. A acetonitrila nesta proporção proporcionou melhor detectabilidade para determinação dos analitos. Foi utilizado dois modificadores da fase móvel como o tampão trietilamina e ácido fosfórico para deixar a solução numa faixa de pH adequada e compatível com o pka dos analitos para que estas não sofressem ionização (Kukanich e Papich, 2004).

O tempo de retenção de 3,5 minutos para o M1 foi igual ao encontrado por Kukanich e Papich (2004). E para o tramadol, o tempo de retenção foi de 6,1 minutos , próximo aos tempos de retenção descritos na literatura quando se emprega a CLAE-FL (Kukanich e Papich, 2004).

A ondansetrona foi o Pi de escolha no estudo embora tenha sido necessário o uso de comprimentos de onda de emissão e excitação distintos para ela em relação ao tramadol e o M1, porém todos os analitos foram analisados na mesma amostra. Isso foi possível devido a sofisticação do aparelho de CLAE-FL.

A ondansetrona possui grupos funcionais polares em sua estrutura química , solubilidade em água e solventes orgânicos, o que pode ter contribuído para detecção no nosso método. A literatura relata que os melhores Pi seriam os produtos deuterados que são moléculas que contém átomos de deutério em vez de hidrogênio em algumas posições, sendo úteis na utilização como Pi porque podem ser distinguidos na análise. Porém a desvantagem de utilizar

esses deutérios é que são caros e pouco disponíveis, além de terem que ser muitas vezes importados e o prazo para entrega bastante variável (Lemos et al., 2000).

O método desenvolvido mostrou-se específico, seletivo, simples e de rápida execução para os analitos em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis nos picos de interesse (tramadol, M1 e do Pi). Os cromatogramas branco hemolisado e não hemolisado foram comparados a cromatogramas da fase móvel e da curva de calibração comprovando que o método atingiu o objetivo, detectando apenas um pico de interesse nos respectivos tempos de retenção dos analitos principais. Além disso, conseguimos desenvolver um método sob condição isocrática de separação de tramadol e M1, o que elimina a necessidade da utilização de gradientes e múltiplas fases móveis, tornando o método mais fácil de aplicar. Os métodos isocráticos oferecem tempos de análise mais rápidos em comparação com os métodos de gradiente, nos quais a composição da fase móvel muda ao longo do tempo (Jandera e Churacek, 1974).

O método demonstrou ser linear porque o estudo da linearidade permite concluir que o método desenvolvido está dentro da faixa de concentração proposta para o tramadol (0,1; 0,2; 1,0 ; 2,0; 4,0; 6,0 $\mu\text{g/mL}$) e para M1 (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Todas as curvas analíticas obtidas, construídas utilizando-se as variáveis concentração (X, $\mu\text{g/mL}$) e a razão das alturas dos picos dos analitos pelas alturas dos picos do Pi (Y), foram lineares, com coeficiente de R^2 superiores a 0,99, demonstrando linearidade entre as respostas do equipamento e as concentrações da curva. Entre o M1 e o tramadol, este último apresentou melhor linearidade (0,9992).

Comparando os valores obtidos no presente estudo com o descrito por Kukanich e Papich (2004) em cães, houve similaridade com bom coeficiente de correlação, sendo superior a 0,99, com todos os valores dentro de 6% da concentração verdadeira esperada. O método se mostrou preciso, com baixo coeficiente de variação, atendendo ao objetivo da análise. Os valores de CV% total intra-dia e inter-dia variaram entre 0,56 a 9,11 para o tramadol, e 1,94 e 6,85 para M1, atendendo aos limites estabelecidos pela ANVISA que devem ser menores de 15%. Essas variações podem estar relacionadas a preparação da fase móvel, a rede elétrica do equipamento e a manipulação entre os analistas.

O método obteve boa exatidão, já que se obteve concordância dos resultados com variação em relação ao valor teórico inferiores a 6%. Porém observa-se que o método foi menos sensível aos métodos encontrados na literatura. A detecção de tramadol foi possível até valores de 0,03 µg/mL para o tramadol e para M1, porém os valores do limite de quantificação do método (0,1 e 0,05 µg/mL) foram piores quando comparado com métodos de outros autores. Sendo que na literatura, pode-se encontrar concentrações até mais baixas, isso é uma limitação encontrada na nossa técnica de CLAE-FL por fatores como a energia da lâmpada utilizada no detector do equipamento, o que poderia ser superada por emprego de técnica mais sensível como a cromatografia acoplada a espectrometria de massas (Pypendop e Ilkiw, 2008; Giorgi et al., 2015; Kimble et al., 2021).

As amostras foram estáveis nas condições utilizadas para análise permitindo a quantificação dentro dos critérios exigidos para a validação analítica. É de salientar a importância de futuramente, desenvolver um método analítico mais sensível para a detecção e quantificação de tramadol e M1 em plasma de jiboias para analisar as concentrações clínicas de forma mais prolongada.

5 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido e analisado por CLAE-FL é uma técnica específica, seletiva, simples e eficaz para quantificação dos fármacos em concentrações de até 0,1 µg/mL de tramadol e 0,05 µg/mL de M1, considerado validado de acordo com o propósito. Para quantificações abaixo desses valores recomenda-se o uso de técnicas mais sensíveis como a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-LC/MS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-EIROA, A., CANLE, M., LEROY-CANCELLIERI, V., & CERDÀ, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 655-667, 2016.

BISETTO, Shayne P.; MELO, Cristiano F.; CARREGARO, Adriano B. Evaluation of sedative and antinociceptive effects of dexmedetomidine, midazolam and dexmedetomidine–midazolam in tegus (*Salvator merianae*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, v. 45, n. 3, p. 320-328, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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, DF, Poder Executivo, de 22 de Maio de 2012.

BUNKE, L. G.; SLADKY, K. K.; JOHNSON, S. M. Antinociceptive efficacy and respiratory effects of dexmedetomidine in ball pythons (*Python regius*). *American journal of veterinary research*, v. 79, n. 7, p. 718-726, 2018.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, v.32, n.4, p.1021-1030, 2009.

CHAO, C. K.; YU, L. L.; LIU, C. M et al. Bioequivalence study of tramadol by intramuscular administration in healthy volunteers: Randomized controlled trial. *Arzneimittelforschung*, v. 50, n. 7, p. 636-640, 2000.

DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova*, v. 7, n. 1 p. 21-25, 1998.

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY). Guideline on bioanalytical method validation. London, jul. 2011. Disponível em: < <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation-scientific-guideline> >. Acesso em: 21 junho. 2022.

GIORGI, M.; SALVADORI, M.; DE VITO, V et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessments of 10 mg/kg tramadol intramuscular injection in yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.38, n.5, p. 488-496, 2015.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial: Orientações sobre validação de métodos analíticos. 2011. Disponível em: <

http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>. Acessado em: 14 jun.2021.

JANDERA, P; CHURACEK, J. Gradient elution in liquid chromatography: The influence of the composition of the mobile phase on the capacity ratio (retention volume, band width, and resolution) in isocratic elution—theoretical considerations. *Journal of Chromatography A*, v. 91, p. 207-221, 1974.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KUKANICH, B.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.27, p.239-246, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente“compatíveis”. *Scientia Chromatographica*, v.1, p.35-61, 2009.

LEMOS, N. P.; ANDERSON, R. A.; ROBERTSON, J. R. The analysis of methadone in nail clippings from patients in a methadone-maintenance program. *Journal of analytical toxicology*, n.24, v.7, p.656-660, 2000.

MALDANER, L.; COLLINS, C.; JARDIM, I. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. *Química Nova*, v.33, n.7, p. 1559-1568, 2010.

NIU, Z; ZHANG, W; YU, C; ZHANG, J. et al. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, n.1, p.123-146, 2018.

OLSSON, A; SIMPSON, M. Analgesia and anaesthesia. *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice*, p. 369-381, 2017

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. et al. validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

CAPÍTULO II. FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL EM PLASMA DE JIBOIAS: DETERMINAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA DO TRAMADOL E O SEU METABÓLITO O-DESMETILTRAMADOL PELA VIA INTRAMUSCULAR.

1 INTRODUÇÃO

Os opioides são analgésicos amplamente utilizados no controle da dor pré, trans e pós-operatória em medicina veterinária. Estas substâncias atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) dos animais, inibindo desde a transdução do estímulo doloroso até a percepção da dor e, de maneira dose e espécie dependente, podem levar à sedação (Whittem et al., 2017; Barakat, 2019; Chao et al., 2000; Doss et al., 2021).

A presença de receptores opioides no SNC de serpentes é um forte indício que os opioides agem como analgésicos nesse local modulando ou inibindo a percepção dolorosa. Entretanto, a farmacologia deste grupo é complexa em termos farmacocinéticos, não só pelo fato que os opioides devem ter a capacidade de se ligar a receptores opioides no cérebro e na medula espinhal, mas também de chegar até esses tecidos (Whittem et al., 2017).

O tramadol é um analgésico sintético, classificado como um opioide atípico já que tem mecanismo de ação misto, atuando em receptores opioides e inibindo a recaptção de noradrenalina e serotonina. É um fármaco que age em dor leve a moderada de várias etiologias melhorando a modulação central da dor (Barakat, 2019).

O tramadol é biotransformado no fígado, no qual a mistura racêmica pode ser convertida em O-desmetiltramadol (M1), que é o principal metabólito ativo da droga, e N-desmetiltramadol (M2) que é inativo a partir da ação da enzima CYP2D6 no hepatócito. O M1 é o principal responsável pela analgesia opioide em diferentes espécies (Vettorato et al., 2010; Cagnardi et al., 2011; Bravo et al., 2017; Barakat, 2019).

Não existem estudos, em serpentes, sobre a farmacocinética e biodisponibilidade do tramadol e nem informações a respeito de seu metabólito ativo, M1. A biodisponibilidade é uma medida quantitativa de quanto do fármaco alcança a corrente sanguínea do animal para causar efeito

terapêutico. A avaliação do tramadol no plasma, se torna imprescindível, como uma medida indireta da sua concentração no SNC, mas também para que seja determinada a farmacocinética deste analgésico e assim apontar um tratamento mais direcionado a estes animais (Chao et al., 2000; Whittem et al., 2017).

Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi realizar a farmacocinética do tramadol, determinar biodisponibilidade, quantificar o metabólito ativo M1, a meia vida de eliminação, o tempo residual médio deste metabólito e apontar as aplicabilidades em serpentes.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionadas 10 jiboias (*Boa constrictor constrictor*) sadias, machos, reprodutores, pesando ($4,33 \pm 1,5\text{Kg}$), provenientes do criatório Jiboias Brasil, licenciado pelo IBAMA/IEF. Os critérios de inclusão foram definidos de modo que apenas animais que apresentavam saudáveis ao exame físico e dentro dos parâmetros de referência para o hemograma, de acordo com o Laboratório Matoso, podiam ser incluídos no estudo.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 171/2021, cadastrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen número A5BCF84, autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO número 78843-1 e pelos proprietários do criatório Jiboias Brasil, criatório licenciado pelo IBAMA/IEF.

O cálculo do n amostral foi definido baseado no trabalho de Itami et al. (2016) que comparou a farmacocinética do tramadol entre cães jovens e de meia idade. Foi definido a partir deste trabalho um delta de 22% da média utilizando a área sob a curva de zero ao infinito como a variável mais instável. A fórmula $\Delta = t \alpha \cdot gl * s/\sqrt{n}$ foi utilizada (Sampaio, 2015).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais de tamanhos: 63,1 x 44,1 x 33,1 cm com capacidade de 68 litros, com pequenos furos para circulação de ar, com substrato de papel toalha, trocadas sempre que necessário. O fornecimento de água era realizado através de potes

plásticos (bebedouros desenvolvidos para cães) *ad libitum*. Essas caixas plásticas eram identificadas com os nomes dos animais.

Antes da experimentação, as serpentes eram pesadas, transferidas e mantidas em sala arejada, destinada a experimentação e com temperatura monitorada, mantida na faixa ótima para a espécie (entre 28 e 30°C). Também foi preconizado o mesmo período do dia para realização das coletas de sangue do experimento, iniciando-se sempre as 6h da manhã. O tempo de *washout* foi de 45 dias para que a serpente fosse novamente testada (Giorgi et al., 2015). Foi realizado estudo do tipo crossover 10x2, em que os animais recebiam tratamento de tramadol por via intramuscular primeiro e depois de 45 dias da aplicação, os mesmos 10 animais recebiam o tratamento por via intravenosa, em administração única.

Os animais foram definidos por sorteio aleatório dentro de um grupo pré-estabelecido pelo criatório. Todos os animais eram machos em idade reprodutiva com peso médio de $4,33 \pm 1,5$ Kg e que haviam se alimentado a duas semanas antes do início do experimento.

Todas as observações foram realizadas pelo mesmo observador e estavam em concordância com os membros participantes do projeto. A manipulação dos animais também foi realizada pelos mesmos membros, a fim de evitar um maior efeito estressor.

As serpentes elegíveis foram alocadas em dois grupos distintos com presença de tramadol, passando por ambos os grupos, num período de washout de 45 dias. Sendo, os grupos nomeados como grupo TRIM e grupo TRIV, respectivamente.

Animais sorteados para o tratamento TRIM, receberam 5mg.kg^{-1} de tramadol na musculatura epaxial no final do terço cranial, e os do tratamento TRIV receberam 5mg.kg^{-1} de tramadol na veia paravertebral no final do terço cranial.

Foram coletadas amostras de sangue nos dois tratamentos, TRIM e TRIV. Sendo os tempos nomeados: 0 (antes da administração), tempo1 (vinte minutos após administração do tramadol); tempo 2 (quarenta minutos após); tempo 3 (sessenta minutos após) tempo 4 (cento e vinte minutos após) T5 (duzentos e quarenta minutos após) T6 (quatrocentos e oitenta minutos após);

T7 (setecentos e vinte minutos após); T8 (mil e oitenta minutos após) e T9 (mil quinhentos e sessenta minutos após) como pode ser observado na Tabela 4. Após esse período experimental a serpente voltava a rotina de origem no criatório Jiboias Brasil.

O sangue coletado (aproximadamente 1,5 mL de sangue em cada tempo) foram colocados em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Em seguida, eles foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (plasma) foi armazenado em tubos de plásticos e congelados a -70°C .

No dia da análise quantitativa do tramadol, amostras de plasma foram descongeladas e analisadas pela CLAE-FL, conforme descrito no capítulo anterior.

A determinação do pico de concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo que ela foi alcançada (T_{max}) foram obtidas diretamente das concentrações medidas. A área sob a curva de concentração (ASC) que representa a quantidade de medicamento absorvido após dose única versus tempo ($ASC_{0 \rightarrow t}$) foi calculada até a última mensuração ($t_{\text{último}}$) usando o método trapezoidal log-linear. A meia vida de eliminação ($t_{1/2}$), que é o tempo necessário para que a concentração plasmática se reduza à metade de um valor inicial, foi determinada pela fórmula $0,693/k_{\text{real}}$, onde k_{real} é a constante de eliminação. A $ASC_{0 \rightarrow \infty}$, a ASCM da última concentração, o tempo médio residual de zero ao infinito ($TMR_{0 \rightarrow \infty}$), o volume de distribuição (V_d), o Clearance (CL) e a biodisponibilidade (F %) observados foram determinadas por equações apresentadas no Quadro 1. (Shargel e Yu., 2012; Baggot e Giguere, 2013).

Quadro 1. Equações utilizadas para análise farmacocinética (adaptado de Shargel e Yu., 2012; Baggot e Giguere, 2013).

Parâmetro	Equações
$t_{1/2}$ (h)	$0,693/k$
$ASC_{0 \rightarrow \infty}$ (ug/mL x h)	$AUC_{0-t} + C_t / K$
$ASCM_{0-t}$ (ug x h ²)/mL	$\Sigma ((C_{t-1} \times T_{t-1}) + (C_t \times T_t) / 2) \times (T_t - T_{t-1})$
$ASCM_{t \rightarrow \infty}$	$(C_t \times T / k) + (C_t / k)$
$ASCM_{0 \rightarrow \infty}$ (ug x h ²) /mL	$ASCM_{0-t} + ASCM_{t \rightarrow \infty}$
Vd (L/kg)	$Dose / ASC_{total} \times K$
Cl(L/h/kg)	$Dose / ASC_{0 \rightarrow \infty}$
$TMR_{0 \rightarrow \infty}$ (h)	$ASCM_{0 \rightarrow \infty} / ASC_{0 \rightarrow \infty}$
F (%)	$(ASC_{IM} \times Dose_{IV} / ASC_{IV} \times Dose_{IM}) \times 100$

($t_{1/2}$) meia vida de eliminação ($ASC_{0 \rightarrow \infty}$) área sob a curva de concentração da concentração zero ao infinito, ($ASCM_{0 \rightarrow t}$) área média sob a curva de concentração da concentração zero ao último tempo; $ASCM_{t \rightarrow \infty}$ área média sob a curva de concentração da concentração do último tempo ao infinito; $ASCM_{0 \rightarrow \infty}$ área média sob a curva de concentração da concentração de zero ao infinito (Vd) volume de distribuição, (CL) Clearance, ($TMR_{0 \rightarrow \infty}$) tempo médio residual de zero ao infinito (F %) biodisponibilidade.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos por emprego de equações modelo independentes, utilizando o programa Excel®2010 (Microsoft®). A distribuição normal dos parâmetros farmacocinéticos foi verificada utilizando o teste de Shapiro Wilk. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Foi realizado o teste T para as amostras pareadas para todas as variáveis, exceto clearance, para qual foi usado o teste de Wilcoxon.

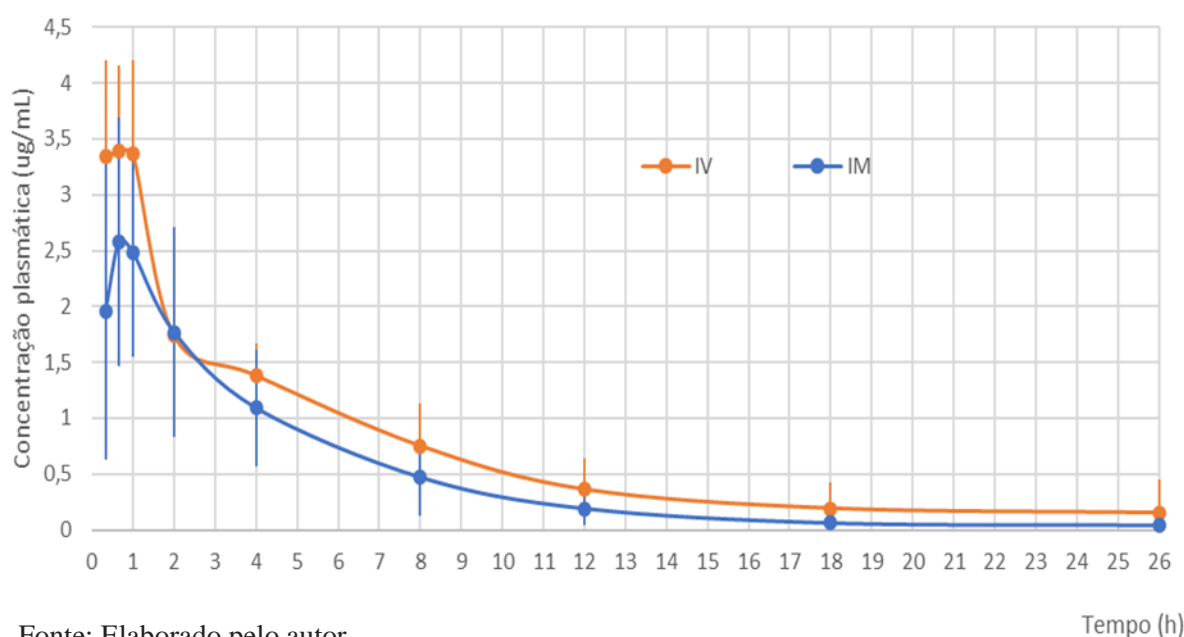
Para avaliação do efeito da via de administração e de tempo sobre a concentração de tramadol e de M1, foi ajustado um modelo linear misto para ambas as variáveis resposta. Foram considerados os efeitos de tempo, via de administração e a interação entre eles como efeitos fixos, e o efeito de animal como aleatório. Posteriormente, foi realizado teste T. O nível de

significância considerado para todas as análises foi de 5%. As avaliações foram realizadas por meio do software R 4.3.0 (R Core Team, 2023).

4 RESULTADOS

Neste estudo, ao avaliar a farmacocinética do tramadol, observamos que após administração intravenosa (IV) na dosagem de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) atingiu $3,39\ \mu\text{g}/\text{mL}$ após 40 minutos da injeção do tramadol (T_2). Contrastando com a via intramuscular (IM), no qual a $C_{\text{máx}}$ foi de $2,58\ \mu\text{g}/\text{mL}$, sendo alcançada no mesmo intervalo de tempo, T_2 . Para uma visualização detalhada das alterações na concentração plasmática do tramadol em relação ao tempo, após administração por ambas as vias, elaboramos as curvas de perfil médio. Estas estão devidamente ilustradas na Figura 13.

Figura 13. Perfil médio de concentração plasmática de tramadol *versus* tempo para a administração intravenosa e intramuscular de tramadol na dose de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($n=10$).



Fonte: Elaborado pelo autor

Tempo (h)

Neste estudo farmacocinético do tramadol na dose $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, observou-se que a meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) para a administração intravenosa foi de $17,32 \pm 7,55$ horas e pela via intramuscular foi de $19,96 \pm 8,34$ horas. Ao avaliar a $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$), os valores obtidos

foram $22,31 \pm 7,71$ e $13,61 \pm 6,49$ para as vias intravenosa e intramuscular, respectivamente (Tabela 16). Adicionalmente, os valores de $TMR_{0 \rightarrow \infty}(h)$ após injeção de tramadol na dose $5mg.kg^{-1}$ administradas por via intravenosa e intramuscular foram $12,38 \pm 8,3$ e $9,29 \pm 5,24$, respectivamente (Tabela 16). Todos esses resultados, assim como o Vd (L/Kg), o Cl (L/h/Kg) e a biodisponibilidade do tramadol na dose $5mg.kg^{-1}$, por via intramuscular, estão registrados na Tabela 16.

Tabela 16 . Parâmetros farmacocinéticos do tramadol, média \pm desvio padrão, na dose $5mg.kg^{-1}$ após administração por via intravenosa e intramuscular em jiboias.

Parâmetros	Intravenoso	Intramuscular
$C_{m\acute{a}x}(\mu g)$	3,39	2,58
$ASC_{0 \rightarrow \infty}(\mu g.h/ml)$	$22,31 \pm 7,71$	$13,61 \pm 6,49$
$t_{1/2}(h)$	$17,32 \pm 7,55$	$19,96 \pm 8,34$
Vd (L/Kg)	$5,60 \pm 1,69$	$10,58 \pm 2,91$
Cl (L/h/Kg)	0,22 (0,15 - 0,26)	0,36 (0,25 - 0,40)
$TMR_{0 \rightarrow \infty}(h)$	$12,38 \pm 8,3$	$9,29 \pm 5,24$
$F(\%)$	-	61

($C_{m\acute{a}x}$): concentração máxima; ($ASC_{0 \rightarrow \infty}$) área sob a curva de concentração da concentração zero ao infinito; ($t_{1/2}$)meia vida de eliminação, ($TMR_{0 \rightarrow \infty}$) tempo médio residual de zero ao infinito, (Vd) volume de distribuição, (Cl) Clearance; (F %) biodisponibilidade.

Para o metabólito M1 a concentração máxima ($C_{m\acute{a}x}$) e o tempo que ela foi alcançada (T_{max}) foram registrados assim como a $t_{1/2}$, $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ e $TMR_{0 \rightarrow \infty}$. Para o M1, a $C_{m\acute{a}x}$ foi de $0,59 \mu g/mL$ após 40 minutos da injeção do tramadol por via IV (T2). E na administração por via IM de tramadol, a $C_{m\acute{a}x}$ de M1 foi de $0,58 \mu g/ml$ após 4 horas da injeção do tramadol (T5). As curvas de perfil médio de concentração plasmática versus tempo ao longo do experimento para a administração intravenosa e intramuscular de tramadol na dose de $5mg.kg^{-1}$ foram apresentadas na Figura 14.

Para o M1, após injeção de tramadol na dose $5mg.kg^{-1}$ administradas por via intravenosa e intramuscular, a meia vida ($t_{1/2}$) foi de $35,66 \pm 10,85$ por via intramuscular e de $49,89 \pm 10,8$ por via intravenosa. Após injeção de tramadol na dose $5mg.kg^{-1}$ administradas por via intravenosa e intramuscular, os valores de $ASC_{0 \rightarrow \infty}(\mu g.h/ml)$ foram respectivamente $36,32 \pm 19,72$ e $48,80 \pm 16,04$. Os valores $TMR_{0 \rightarrow \infty}(h)$ foram $77,46 \pm 0,74$ e $97,99 \pm 3,84$ (Tabela 17).

Figura 14. Perfil médio de concentração plasmática de metabólito (M1) versus tempo para a administração intravenosa de tramadol e intramuscular de tramadol na dose de 5mg.kg^{-1} (n=10).

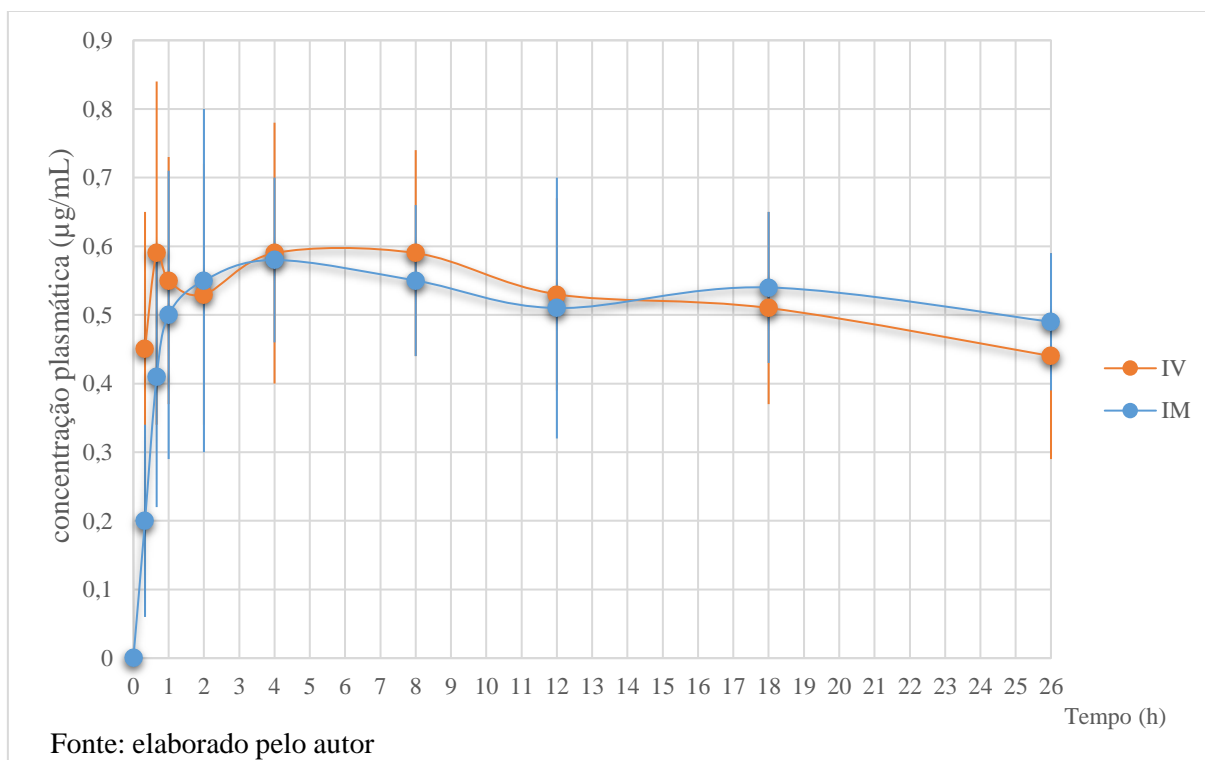


Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos do M1, média \pm desvio padrão, na dose 5mg.kg^{-1} após administração de tramadol por via intravenosa e intramuscular em jiboias.

Parâmetros	Intravenoso	Intramuscular
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/ml}$)	0,59	0,58
$ASC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g.h/ml}$)	$36,32 \pm 19,72$	$48,80 \pm 16,04$
$t_{1/2}$ (h)	$35,66 \pm 10,85$	$49,89 \pm 10,8$
$TMR_{0 \rightarrow \infty}$ (h)	$77,46 \pm 0,74$	$97,99 \pm 3,84$

($C_{\text{máx}}$): concentração máxima; ($ASC_{0 \rightarrow \infty}$) área sob a curva de concentração da concentração zero ao infinito; ($t_{1/2}$)meia vida de eliminação, ($TMR_{0 \rightarrow \infty}$) tempo médio residual de zero ao infinito.

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a biodisponibilidade e farmacocinética da administração de tramadol na dose de 5mg.kg^{-1} pelas vias IV e IM. A quantificação do metabólito, assim como a $t_{1/2}$ (h) e o $\text{TMR}_{0 \rightarrow \infty}(\text{h})$ foram definidos.

Este estudo é pioneiro em realizar esta metodologia em serpentes. Em répteis, o tramadol foi pouco estudado e realizar a farmacocinética do tramadol em serpentes, quantificando o seu principal metabólito, o M1, é também algo inédito. A dose de 5mg.kg^{-1} utilizada, assim como, a via intramuscular de administração deste fármaco também não foram relatadas em serpentes, por isso a importância de pesquisá-la nestes animais.

O tramadol vem sendo bastante utilizado na prática clínica de répteis como analgésico para o tratamento da dor leve a moderada devido a sua ação mista: opioidérgica, noradrenérgica e serotoninérgica. É um dos fármacos indicados para o tratamento multimodal da dor (Barakat, 2019). E em algumas espécies como cães e felinos, tem sido demonstrado o efeito analgésico (Kukanich e Papich, 2004; Cagnardi et al., 2011; Cagnardi et al., 2014).

As características farmacocinéticas como boa absorção, biodisponibilidade elevada e grande volume de distribuição. E as características farmacodinâmicas como ausência de efeitos cardiorrespiratórios em doses usuais, documentadas em algumas espécies, encorajam a utilização deste fármaco em répteis (Baker et al., 2011; Giorgi et al., 2015; Norton et al., 2015).

No intuito de estabelecer uma relação entre as doses utilizadas previamente nas diferentes espécies de répteis (Giorgi et al., 2015; Gris, 2018) e de observar uma possível similaridade no padrão farmacocinético em *Boa constrictor*, além de verificar por meio de inspeção física se a administração do fármaco não causa alteração no comportamento e na taxa de mortalidade dos animais selecionados, optamos por uma dose de tramadol por via intramuscular na dose de 5mg.kg^{-1} (Baker et al., 2011; Giorgi et al., 2015; Norton et al., 2015).

Os estudos farmacocinéticos apresentam diversos fatores que justificam diferentes mensurações do fármaco principal e dos metabólitos, como dos parâmetros analisados. Fatores como

diferenças entre espécies, interespecie e metodologias aplicadas em cada estudo devem ser levados em consideração para comparações dos resultados encontrados. No nosso estudo, todos os animais utilizados eram machos em idade reprodutiva, a fim de minimizar a variabilidade entre os indivíduos.

Os animais eram hígidos e apresentavam escores corporais adequados. Existem grandes variações hematológicas entre os representantes, a estação do ano, o sexo e grau de estresse também podem exercer influência nestes índices, sendo assim os exames hematológicos foram realizados apenas como critério de inclusão e atestar a higidez dos animais (Quadrini et al., 2018; Martins e Braga 2023).

Não foi observado efeito adverso, como a regurgitação, e nem morte após a administração de tramadol na dose de $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via IV ou IM em serpentes deste estudo. Foi observado que no T9, 6 jiboias que receberam tramadol por via intravenosa, ficaram durante a captura e contenção tranquilizadas, demonstrando menor reação de fuga a captura, menor tempo de reação em se enrolar durante a captura e menor movimentação na coleta de sangue. Este fato pode estar relacionado ao efeito prolongado do tramadol em répteis (Giorgi et al., 2015) que neste tempo, em nosso estudo apresentava por via intravenosa concentração média de $0,15\mu\text{g}/\text{ml}$ enquanto por via intramuscular a concentração média foi de $0,04\mu\text{g}/\text{ml}$.

Após administração intravenosa de tramadol, este fármaco foi detectado e quantificado em até 26 horas de análise. O metabólito M1 foi analisado até 26 horas após aplicação do tramadol, último tempo de coleta de sangue. Uma das limitações do nosso método, foi na detecção do tramadol após essas 26h. Pela Figura 13, podemos visualizar que o perfil médio de concentração plasmática de tramadol se encontra no seu limite mais baixo de detecção, nos indicando que em coletas posteriores não haveria quantificação do fármaco. Além disso, pode-se perceber que o desvio padrão dos animais, neste tempo, está bem alto demonstrando a variabilidade entre os indivíduos. Para um primeiro estudo e análise dos dados, assim como recursos limitados e tempo hábil para a otimização e validação do método e atrasos nas importações dos analitos padrão foi determinante para que as análises fossem apenas até 26h.

O presente estudo foi possível devido a parceria realizada com o Laboratório de Controle de Qualidade da Escola de Farmácia, que possibilitou a realização da farmacocinética do tramadol por via intramuscular na dose de 5mg.kg^{-1} , além da quantificação do metabólito M1 e dos parâmetros farmacocinéticos como a meia vida de eliminação e o tempo residual médio do M1.

A eficácia analgésica pela ação opioide do tramadol em mamíferos é mais relacionada à produção do metabólito M1, do que pela inibição da recaptção da noradrenalina e serotonina até o momento (Grond e Sablotki, 2004; Haage, 2018; Kimble et al., 2021). Desta forma é importante saber que as serpentes conseguem produzir este metabólito. Para que haja a formação do M1, a biotransformação está diretamente relacionada à espécie animal e a função hepática do indivíduo, além dos polimorfismos do alelo CYP450, que podem alterar parâmetros farmacocinéticos como velocidade de sua biotransformação (Ruel e Steagall, 2019).

Atualmente, existem alguns estudos demonstrando a farmacocinética e farmacodinâmica do tramadol, pelas vias oral e intramuscular, mas com resultados analgésicos diferentes entre as espécies, sendo o metabólito M1 o responsável pela eficácia analgésica na ordem Testudine, principalmente em quelônios (Norton et al., 2015; Giorgi et al., 2015). A C_{max} do tramadol para promover analgesia ainda não foram definidas em répteis. Em humanos a concentração plasmática mínima efetiva já relatada de tramadol e M1 foi de aproximadamente 100 a 500 ng/mL para o tramadol e 36 a 84 ng/mL para o M1 (Kukanich e Papich, 2004; knych et al., 2013; Benitez et al., 2015; kimble et al., 2021). Em nosso estudo, uma única dose de 5mg.kg^{-1} de tramadol administrada por via IV produziu uma C_{max} de tramadol de $3,39\ \mu\text{g/mL}$ (3390 ng/mL) e de M1 de $0,59\ \mu\text{g/mL}$ (590 ng/mL), (Kukanich e Papich, 2004; knych et al., 2013; Benitez et al., 2015; kimble et al., 2021).

Comparando nossos valores com o trabalho de Giorgi et al. (2015), que após administração de 10mg/kg de tramadol em *Trachemys scripta scripta* por via intramuscular, obteve uma C_{max} de $58,22$ e $3,29\ \mu\text{g/mL}$ de M1, neste estudo, na ordem ofídia, foi obtido uma concentração menor do que esperado de tramadol e M1, mas, em relação à biotransformação de tramadol, o M1 foi muito mais produzido em serpente, se comparamos com a biotransformação em tigre d'água de barriga amarela. Sendo assim podemos inferir que, da mesma forma que cães

produzem menor quantidade de metabólito que gatos porque têm menor quantidade de enzimas da família CYP2D15 que transformam o tramadol em M1, *Trachemys scripta* podem possuir menores quantidades de enzimas que as serpentes, além disso a metabolização tecidual do fármaco pode ser diferente entre os representantes (Corado et al., 2016; Obeng et al., 2017; Perez et al., 2018; Ruel e Steagall, 2019).

Segundo Barker et al.(2011), após estudo clínico com tigre d'água de orelha vermelha, a administração de tramadol por via oral na dose de 5mg.kg^{-1} , já seria suficiente para causar analgesia térmica. No nosso estudo, o tramadol aplicado por via intramuscular produziu uma C_{max} de $2,58\mu\text{g/mL}$. Gris (2018) após administração 5mg.kg^{-1} de tramadol por via IV em jabutis-piranga encontrou C_{max} de $0,65\mu\text{g/mL}$ de tramadol. Já para via IM foi de $0,128\mu\text{g/mL}$, não sendo relatado efeito antinociceptivo da administração de 5mg.kg^{-1} por via intravenosa, nem mesmo na dose de 10mg.kg^{-1} por via intramuscular. Diante disso, podemos observar que jabutis- piranga podem ter uma biodisponibilidade menor que serpentes e a metabolização tecidual pode ser alta, quando o tramadol é aplicado por via IM.

Após 26h da administração de tramadol, ainda se observou que a concentração de M1 permaneceu alta, umas das limitações do trabalho. Coletar amostras de plasma em momentos posteriores a 26 horas forneceria uma determinação mais precisa do perfil plasmático de M1. No entanto, devido ao tempo necessário para importar o padrão do metabólito e à quantidade de sangue coletada por animal utilizada na determinação e validação do método, adicionar mais coletas ultrapassaria a porcentagem de sangue indicado por peso vivo (Quadrini et al., 2018). Isso ocorre porque exceder a quantidade recomendada de coleta de sangue por peso vivo pode prejudicar a saúde do animal e atrapalhar o potencial reprodutivo. Além disso, considerando o bem-estar dos animais reprodutores do criatório, optamos por não realizar coletas adicionais.

A $t_{1/2}$, do tramadol que indica quanto tempo leva para a concentração no organismo diminuir pela metade, foi longa. Este fato já foi relatado em répteis, e que ocorre de maneira diferente da relatada em cães, gatos e equinos (Kukanich e Papich, 2004; Pypendop e Ilkiw, 2008; Cagnardi et al., 2014; Giorgi et al., 2015; Norton et al., 2015). No nosso estudo a $t_{1/2}$ foi de $17,32 \pm 7,55$ horas quando aplicado por via intravenosa e $19,96 \pm 8,34$ horas quando aplicado

por via intramuscular. Valores que podem ser considerados próximos ao comparar com estudos em jabutis-piranga que receberam tramadol na dose $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ por via intravenosa e intramuscular respectivamente ($21,22 \pm 8,74$; $32,84 \pm 6,41$) (Gris, 2018). E em tigrés d'água que receberam $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de tramadol por via IM ($28,7 \pm 15,77$) (Giorgi et al., 2015). Estes valores suportam a teoria que o tramadol foi amplamente convertido em metabólito e, portanto, essa conversão resulta numa diminuição da concentração plasmática do composto original e proporcionaria uma maior taxa de eliminação do tramadol (Berezhkovskiy, 2016).

A $t_{1/2}$ de eliminação do M1, neste estudo, caiu pouco durante as 26 horas de análise. Quando o tramadol foi administrado por via intravenosa a $t_{1/2}$ do M1 foi de $35,66 \pm 10,85$ horas e pela via IM de $49,89 \pm 10,8$, assim o fármaco alcançaria estado de equilíbrio em cerca de 4 a 5 $t_{1/2}$, portanto demoraria aproximadamente 5 dias por via IV e 8 dias por via IM (Shargel e Yu., 2012). Para que fosse mais preciso a determinação da $t_{1/2}$ de eliminação, seria necessário coletas de sangue por mais 24 horas. Podemos inferir que a meia vida longa está relacionada ao acúmulo de fármaco extraplasmático, em tecidos pouco perfundidos como os músculos, o que impede a eliminação deste pelos rins. E com relação a $t_{1/2}$ do M1, além do acúmulo em tecidos extraplasmáticos, como em rins e fígado (Pypendop e Ilkiw, 2008), o baixo metabolismo dos répteis, pode explicar a duração de eliminação do fármaco quando este é produzido em grande quantidade. Isso significa que o metabólito permanece ativo por mais tempo nos répteis antes de ser eliminado (Giorgi et al., 2015; Berezhkovskiy, 2016).

O Vd no presente trabalho foi alto, $5,6 \pm 1,69$ L/kg pela via intravenosa e $10,58 \pm 2,91$ pela via intramuscular, corroborando com outros estudos nas diversas espécies (Benitez et al., 2015; Giorgi et al., 2015; kimble et al., 2021). Em uma análise farmacocinética do tramadol no organismo humano, pode-se observar simultaneamente um volume de distribuição (Vd) elevado e uma área sob a curva (ASC) também alta. Isso sugere que, após a administração, o tramadol não apenas penetra extensivamente nos tecidos, refletindo um Vd alto, mas também permanece por um período prolongado na circulação sistêmica, indicado pela AUC elevada. Isso pode ser atribuído às características intrínsecas do tramadol, como sua solubilidade, ligação a proteínas plasmáticas e metabolismo (Klotz, 2003; Skopp, 2004; Reece, 2006).

Os valores de depuração demonstram que a eliminação do tramadol foi de $0,22 \pm 0,05$ Kg/h/L quando a administração pela via IV e, de $0,36 \pm 0,07$ Kg/h/L pela via IM demonstrando que a eliminação do fármaco é demorada. Já esperado visto que estes animais possuem um metabolismo mais lento, menores taxas de filtração glomerular e de reabsorção tubular. A urina destes animais também não é tão concentrada igual à dos mamíferos, devido a ineficiência dos mecanismos de reabsorção de água nos túbulos renais (Giorgi et al., 2015). Giorgi et al. (2015) encontrou valores ainda menores, cerca de $0,034$ Kg/h/L em *Trachemys scripta scripta* após administração de tramadol em membro anterior. Neste estudo, os resultados corroboram para dados da literatura, em que o clearance pode ser maior nos escamados em relação aos quelônios (Lai et al., 2015; Hawkins et al., 2019).

O tempo médio de residência do tramadol foi de $12,38 \pm 8,3$ horas pela via IV e $9,29 \pm 5,24$ pela via IM demonstrando que pela via IV, a alta concentração faz com que o fármaco permaneça por mais tempo no organismo, o que pode ser ainda justificado pela biotransformação geral reduzida que esses animais apresentam.

A biodisponibilidade para a administração por via intramuscular encontrada foi de 61%. A determinação da biodisponibilidade absoluta para a administração intramuscular, em que se emprega a avaliação do parâmetro $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ possibilita avaliar a biodisponibilidade de um fármaco e seus metabólitos. O valor da $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g.h/ml}$) para o tramadol foram respectivamente de $22,31 \pm 7,71$ por via IV e $13,61 \pm 6,49$ por via IM. Para o metabólito M1 no presente estudo os valores foram de $36,32 \pm 19,72$ e $48,80 \pm 16,04$ de M1. Giorgi et al. (2015) não fez a biodisponibilidade do tramadol ao administrar 10mg/kg de tramadol na região posterior de *Trachemy scripta scripta*, mas obtiveram valores de $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\mu\text{g.h/ml}$) de $398,50 \pm \mu\text{g.h/ml}$ de tramadol e $131,64 \pm 30,72$ de M1 maiores que no nosso estudo, isso demonstra a diferença entre as ordens, sendo que para *Trachemy scripta scripta* houve maior absorção do tramadol.

Em serpentes, com base nos resultados demonstrados na Figura 13, o emprego do tramadol pode ser eficaz pela via intramuscular. Conforme evidenciado, em *Boa constrictor constrictor*, o tramadol aplicado por via IM, estatisticamente, mantém a equivalência do tramadol por via

IV no T4 (duas horas após administração). Portanto, a praticidade desta via, assim como a menor manipulação do animal, a menor chance de hematomas, falhas e invasibilidade conferem vantagens para a administração intramuscular.

Com relação ao M1, na Figura 14, podemos observar que há uma significativa formação do metabólito ativo M1 e que este por via IM mantém concentrações semelhantes a via IV a partir de T3 até o final do experimento. Além disso, este metabólito é o principal analgésico relacionada ao tramadol. Neste contexto, para dores crônicas ou dores pós-operatórias, quando o tramadol é utilizado em associação com antiinflamatórios não esteroidais, ele aplicado por via intramuscular pode desempenhar um papel adjuvante na analgesia (Ruel e Steagall, 2019).

Opioide em tecidos extraplasmáticos, no qual existem receptores opioides espalhados pelo corpo pode ser interessante do ponto de vista analgésico, uma vez que o tramadol tem ação periférica e central. E em dores nociceptiva, inflamatória e patológica (Barakat, 2019).

A vantagem de utilizar um modelo independente para calcular parâmetros farmacocinéticos, conforme demonstrado neste estudo, é que esses parâmetros podem ser aplicados a qualquer via de administração. Porém, é importante ressaltar que a absorção e a eliminação do medicamento devem seguir a farmacocinética linear (Baggot e Giguere, 2013). É importante destacar também que este estudo foi um estudo farmacocinético, portanto não é capaz de determinar diretamente se uma dose de 5mg.kg^{-1} de tramadol causa efeito analgésico real em serpentes. As concentrações analgésicas efetivas foram extrapoladas de humanos, cães e outros répteis para comparar as concentrações plasmáticas em jiboias já que a interpretação da dor nesses animais é desafiadora.

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo sobre a farmacocinética do tramadol em serpentes.

No presente estudo as determinações dos parâmetros farmacocinéticos e a biodisponibilidade absoluta por via intramuscular do tramadol foi determinada por uma abordagem não compartimental. Pode-se concluir que independentemente da via de administração em serpentes, o tramadol é rapidamente biotransformado em M1, resultando em altas concentrações por um período prolongado.

A administração de tramadol na dose de 5mg.kg^{-1} por via IM pode ser uma boa alternativa em serpentes, já que o M1, o principal analgésico opioide do tramadol, foi quantificado em altas concentrações no plasma de jiboias e manteve equivalência estatística após um período de 1 hora da aplicação por via IV, porém são necessários estudos clínicos que correlacionem nossos achados com a farmacodinâmica em serpentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGGOT, J. D.; GIGUÈRE, S. Principles of antimicrobial drug bioavailability and disposition. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, p. 41-77, 2013.

BAKER, B.; SLADKY, K.; JOHNSON, S. Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.238, n.2, p. 220-227, 2011.

BARAKAT, A. Revisiting tramadol: a multi-modal agent for pain management. *CNS drugs*, v. 33, n. 5, p. 481-501, 2019.

BENITEZ, M. E.; ROUSH, J. K.; KUKANICH, B. et al. Pharmacokinetics of hydrocodone and tramadol administered for control of postoperative pain in dogs following tibial plateau leveling osteotomy. *American Journal of Veterinary Research*, v.76, n.9, p.763-770, 2015.

BEREZHKOVSIIY, L. M. On the accuracy of calculation of the mean residence time of drug in the body and its volumes of distribution based on the assumption of central elimination. *Xenobiotica*, v. 46, n. 6, p. 477-482, 2016.

BRAVO, L.; MICO, J. A.; BERROCOSO, E. Discovery and development of tramadol for the treatment of pain. *Expert opinion on drug discovery*, v.12, n.12, p.1281-1291.

CAGNARDI, P.; FERRARESI, C.; ZONCA, A et al. Clinical pharmacokinetics of tramadol and main metabolites in horses undergoing orchiectomy. *Veterinary Quarterly*, v.34, n.3, p.143-151, 2014.

CAGNARDI, P.; VILLA, R.; ZONCA, A. et al. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. *Res Vet Sci*, v.90, p.503-509, 2011.

CHAO, C. K.; YU, L. L.; LIU, C. M et al. Bioequivalence study of tramadol by intramuscular administration in healthy volunteers: Randomized controlled trial. *Arzneimittelforschung*, v. 50, n. 7, p. 636-640, 2000

CORADO, C. R., MCKEMIE, D. S., YOUNG, A. et al. Evidence for polymorphism in the cytochrome P450 2D50 gene in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.39, n.3, p. 245-254, 2016.

DIVERS, S. J.; PAPICH, M.; MCBRIDE, M. et al. Pharmacokinetics of meloxicam following intravenous and oral administration in green iguanas (*Iguana iguana*). *American Journal Veterinary Research*, v.71, n.11, p.1277-1283, 2010.

DOSS, G. A.; MANS, C.; SLADKY, K. K. Analgesia, Anesthesia, and Monitoring. *Exotic Animal Emergency and Critical Care Medicine*, p. 746-757, 2021.

GIORGI, M.; SALVADORI, M.; DE VITO, V et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessments of 10 mg/kg tramadol intramuscular injection in yellow-bellied slider turtles (*Trachemys scripta scripta*). *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.38, n.5, p. 488-496, 2015.

GRIS, V. N. (2018) Avaliação dos efeitos antinociceptivos e farmacocinética do tramadol em jabutis-pirang. Dissertação (Mestrado em clínica cirúrgica e veterinária). Pós graduação Universidade de São Paulo, SP. 80f.

HAWKINS, S. J.; COX, S.; YAW, T. J. et al. Pharmacokinetics of subcutaneously administered hydromorphone in bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Anaesthesia Analgesia*, v.46, n.3, p.352-359, 2019.

ITAMI, T.; SAITO, Y.; ISHIZUKA, T. et al. Comparison of pharmacokinetics of tramadol between young and middle-aged dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 78, n. 6, p. 1031-1034, 2016.

KIMBLE, B.; VOGELNEST, L.; VALTCHEV, P. et al. Pharmacokinetic profile of injectable tramadol in the koala (*Phascolarctos cinereus*) and prediction of its analgesic efficacy. *Plos One*, v.16, n.3, 2021.

KLOTZ, U. S. Tramadol - the impact of its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties on the clinical management of pain. *Arzneimittelforschung*, v 53, n. 10, p. 681-687, 2003

KNYCH, H.K.; CORADO, C.R.; MCKEMIE, D.S. et al. Pharmacokinetics and selected pharmacodynamic effects of tramadol following intravenous administration to the horse. *Equine Vet J*, v.45, p. 490-496, 2013.

KUKANICH, B.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyltramadol in dogs. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics*, v.27, p.239-246, 2004.

LAI, O. R.; DI BELLO, A.; SOLOPERTO, S. et al. Pharmacokinetic behavior of meloxicam in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) after intramuscular and intravenous administration. *Journal Wildlife Diseases*, v.51, n.2, p. 509-512, 2015.

MARTINS, A. C; BRAGA, R. Alternative therapy improves hematological profiles of captive snakes from northeastern Brazil. *Journal of Health & Biological Sciences*, p.11, v.1, p.1-7, 2023.

NORTON, T.M.; COX, S.; NELSON, J. et al. Farmacocinética de tramadol e O-desmetiltramadol em tartarugas marinhas cabeçudas (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.46, n.2, p. 262-265, 2015.

OBENG, A. O.; HAMADEH, I.; SMITH, M. Review of Opioid Pharmacogenetics and Considerations for Pain Management. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 37, p. 1105–1121, 2017.

PEREZ JIMENEZ, T. E.; MEALEY, K. L.; SCHNIDER, D. Identification of canine cytochrome P-450s (CYP s) metabolizing the tramadol (+)-M1 and (+)-M2 metabolites to the tramadol (+)-M5 metabolite in dog liver microsomes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.41, n.6, p.815-824, 2018.

PYPENDOP, B. H.; ILKIW, J. E. Pharmacokinetics of tramadol, and its metabolite O-desmethyl-tramadol, in cats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 31, n. 1, p. 52-59, 2008.

QUADRINI, A. E. et al. Haematological reference of snakes: Amazon tree boa (*Corallus hortulanus*, Linnaeus, 1758) and Burmese Python (*Python bivittatus*, Kuhl, 1820) in captive. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, p. 1172-1178, 2018.

R CORE TEAM. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. <<https://www.R-project.org/>>.

REECE, W. Fluidos corpóreos e o sangue. In: DUKES, H. *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 15-60.

RUEL, H. L., & STEAGALL, P. V. Adjuvant analgesics in acute pain management. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49(6), 1127-1141, 2019.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada a Experimentação Animal*. 4. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2015.

SHARGEL, L.; YU-PONG, S. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics* vol. 264. Stamford: Appleton & Lange, 2012, 929p.

SKOPP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. *Forensic Science International*, v.142, n.2-3, p.75-100, 2004

VETTORATO, E.; ZONCA, A.; ISOLA, M. et al. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. *The Veterinary Journal*, v.183, n.3, p.310-315, 2010.

WHITTEM, T.; BETHS, T.; BAQUIER, S. Farmacologia geral dos agentes anestésicos e analgésicos. In: LUMB & JONES. (5ªEd). Anestesiologia e Analgesia em veterinária. Rio de Janeiro: Roca, 2017. p. 442-525.