



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

TALYTA LINS NUNES

**TRAMADOL EM CAPRINOS: EFEITOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICA E
BIODISPONIBILIDADE**

MOSSORÓ

2017

TALYTA LINS NUNES

**TRAMADOL EM CAPRINOS: EFEITOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICA E
BIODISPONIBILIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA) como exigência
final para obtenção do título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Veras de
Paula

MOSSORÓ-RN

2017

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

L973t Lins Nunes, Talyta.

TRAMADOL EM CAPRINOS: EFEITOS CLÍNICOS,
FARMACOCINÉTICA E BIODISPONIBILIDADE / Talyta Lins

Nunes. - 2017.

85 f. : il.

Orientadora: Valéria Veras de Paula.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

1. Analgesia. 2. Pequenos ruminantes. 3.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

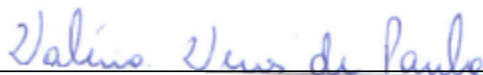
TALYTA LINS NUNES

**TRAMADOL EM CAPRINOS: EFEITOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICA E
BIODISPONIBILIDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA) como exigência
final para obtenção do título de Doutor no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Defendida em: 24 /04 /2017.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Valéria Veras de Paula (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Carlos Campos Câmara (UFERSA)
Membro Examinador



Profa. Dra. Lilian Grace da Silva Solon (UNIFAP)
Membro Examinador



Prof. Dr. José Trinidad Perez Urizar (UASLP)
Membro Examinador



Profa. Dra. Isabella de Oliveira Barros (UFPB)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TALYTA LINS NUNES – Ingressou no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, no Rio Grande do Norte no ano de 2007, colando grau no ano de 2011. Apresentou monografia intitulada Parâmetros clínicos e valores hemogasométricos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no semiárido nordestino, sob orientação da professora doutora Valéria Veras de Paula. Durante a graduação foi Monitora da disciplina de Anestesiologia Veterinária (2009 a 2010) onde desenvolveu atividades de apoio ao aprendizado dos alunos das disciplinas de anestesiologia e técnica cirúrgica. Posteriormente foi bolsista de iniciação científica do CNPq no período de julho de 2010 a julho de 2011. Atraída pela pesquisa e docência, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPCA) da UFERSA em 2012 e realizou migração em fluxo contínuo para o doutorado, tendo obtido o título de mestre em 2013 com dissertação intitulada “Dose terapêutica e farmacocinética do tramadol em caprinos submetidos à orquiectomia”. Na pós-graduação foi ampliado o contato com a docência através do estágio docência nos anos 2012 a 2014 ministrando 48 horas na disciplina de Anestesiologia Veterinária do curso de Medicina Veterinária da UFERSA. Iniciou a orientação na pós-graduação através da preceptoria na área de Anestesiologia Veterinária, vinculada ao Programa de Pós-Graduação Lato Sensu, modalidade em área Profissional da Saúde e credenciado pela Comissão Nacional de Residência Multiprofissional em Saúde, com início em 2015. Participou de diversos projetos de pesquisas vinculados a dor, analgesia, bem-estar animal e farmacocinética. Recentemente foi nomeada professora da disciplina de Anestesiologia da Universidade Federal da Bahia.

À minha família, em especial aos meus pais, Esivaldo Lins de Oliveira e Maria do Socorro Nunes de Oliveira, e minha irmã Antônia Tayná Lins Nunes, pelo amor, carinho, apoio, incentivo, paciência e dedicação. Vocês são minha força e vontade de vencer.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu alicerce, minha base e porto seguro, agradeço por todas as bênçãos.

À minha orientadora, Professora Valéria Veras de Paula, pelos constantes ensinamentos e conhecimentos compartilhados. Agradeço a confiança, paciência, dedicação e sobretudo amizade durante todo esse tempo. Minha enorme gratidão por sua orientação desde a graduação até o doutorado. Sem dúvidas, o seu exemplo foi o que lapidou a pessoa e profissional que sou hoje. Obrigada por ter sido além de orientadora, uma amiga, irmã, mãe, durante todos esses anos que trabalhamos juntas.

Ao professor José Perez Urizar (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México). Agradeço toda a contribuição durante o desenvolvimento desta pesquisa, a enorme gentileza e colaboração na realização das análises.

À minha amiga Professora Lílian Grace, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, agradeço pela paciência, ensinamentos e especialmente pelo empenho durante as análises cromatográficas.

À minha amiga, Professora Isabella Barros, agradeço muito por aceitar participar da banca e contribuir para o engrandecimento do trabalho. Muito obrigada pelo apoio de sempre, pela alegria contagiante, toda ajuda e constante preocupação.

Ao Professor Carlos Campos Câmara, agradeço a disponibilidade e gentileza em aceitarem participar desta banca.

Ao Raimundo Alves Barrêto Júnior, por toda contribuição para o desenvolvimento desta pesquisa, desde a aquisição dos animais até a realização dos procedimentos cirúrgicos. Seu comprometimento e ajuda foram indispensáveis para finalização desta etapa. Além disto, obrigada pelo apoio, cumplicidade, conselhos, incentivo e toda paciência. Agradeço a Deus pela nossa parceria no dia-a-dia e pela família que construímos.

Aos amigos do grupo de anestesiologia veterinária, que se dedicaram durante o desenvolvimento desta pesquisa: Alessandro Magno, Amara Gyane, Ariana Lopes, Caio Lima, Maria Gláucia, Naftali Silva, Yanna Deyse. Aos amigos do LabMult da UFRN, especialmente o dedicado e responsável Leandro Vinícius. O apoio de vocês foi fundamental para a execução deste estudo.

Ao Professor Jeferson Dombroski e Paulo, do Centro de Ciências Agrárias da UFERSA, agradeço a disponibilidade do LCMS e ajuda durante as análises desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto nº 474936/2013-9.

Aos meus familiares, por cada gesto de carinho e de atenção. Agradeço especialmente meus pais, Esivaldo Lins e Socorro Nunes, e minha irmã Tayná Lins, por entender minha ausência e por todo esforço que fizeram para que eu pudesse concluir esta fase. Muito obrigada por tudo.

Aos meus pais e irmãos de coração, Djalma Lins e Fátima Santos, e Ademar, Priscilla agradeço pela acolhida e apoio em Mossoró. Vocês têm um papel singular nessa jornada e agradeço de verdade por toda ajuda.

À tio Wellington, por toda contribuição nesses anos todos, agradeço por sempre incentivar e mostrar diariamente a importância da educação.

À Maria Gláucia e Amara Gyane, sou grata pela ajuda e companheirismo. Agradeço sobretudo a dedicação e paciência nesses últimos meses, o incentivo em cada concurso, a força transmitida por vocês e torcida para que tudo fosse finalizado da melhor maneira possível.

À Maria Alice e Maria Rociene, agradeço a amizade, força, conselhos e constante preocupação.

À cada um que contribuiu de forma direta ou indireta para a finalização deste trabalho. Muito obrigada.

TRAMADOL EM CAPRINOS: EFEITOS CLÍNICOS, FARMACOCINÉTICA E BIODISPONIBILIDADE

NUNES, Talyta Lins. **Tramadol em caprinos: efeitos clínicos, farmacocinética e biodisponibilidade**. 2017. 85f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Morfofisiologia e biotecnologia animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017.

RESUMO: O tramadol é um analgésico opioide atípico amplamente utilizado em humanos e na rotina da clínica de pequenos animais. Devido ausência de estudos que determinam as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, sua utilização em animais de produção é restrita. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar os efeitos clínicos, farmacocinética e biodisponibilidade do tramadol em caprinos. O estudo foi dividido em duas fases: na primeira, realizou-se avaliação dos efeitos clínicos do tramadol nas doses de 2 e 4 mg/kg intravenoso em caprinos submetidos a orquiectomia e na segunda etapa, realizou-se avaliação da biodisponibilidade e dos parâmetros farmacocinéticos do tramadol e O-desmetiltramadol após administração intravenosa e intramuscular em caprinos, na dose de 4 mg/kg. O opioide mostrou-se seguro e eficaz no controle da dor da orquiectomia, devendo ser administrado a cada 6 e 8 horas, nas doses de 2 e 4 mg/kg. O opioide intramuscular tem biodisponibilidade de 62%. Os dados desta pesquisa fornecem informações relevantes a respeito do tramadol e seus metabólitos e servem de base para estudos futuros envolvendo o fármaco e a matriz biológica.

Palavras-chave: Analgesia. Pequenos ruminantes. Opioide.

ABSTRACT

Tramadol is an atypical opioid analgesic widely used in humans and in the routine of the small animal clinic. Due to the lack of studies that determine its pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics, its use in production animals is restricted. The objective of this research was to evaluate the clinical, familial and bioavailability effects of tramadol in goats. The study was divided into two phases: the first one evaluated the clinical effects of tramadol at doses of 2 and 4 mg / kg intravenously; In the second stage, the bioavailability and pharmacokinetic parameters of tramadol and O-desmethyltramadol were evaluated after intravenous and intramuscular administration at a dose of 4 mg / kg. Opioid has been shown to be safe and effective in the control of orchietomy pain and should be given every 6 and 8 hours at doses of 2 and 4 mg / kg. The intramuscular opioid has bioavailability of 62%. The data from this research provide information on tramadol and its metabolites, and serve as the basis for future studies involving the drug and the plasm.

Keywords: Analgesia. Small Ruminant. Opioid.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 01

Figura 01	Representação gráfica da curva padrão de tramadol em plasma caprino, obtido por meio de CLAE	29
Figura 02	Espectro de absorção do tramadol obtido em quatro diferentes pontos do pico	30
Figura 03	Visualização tridimensional do espectro do tramadol em plasma caprino, demonstrando não haver interferência dos outros componentes da matriz biológica	30
Figura 04	Cromatograma em que são evidenciados os picos do tramadol e padrão interno, secnidazol, em plasma caprino, obtido por meio de CLAE ...	31
Figura 05	Representação esquemática do modelo aberto de dois compartimentos para descrever a farmacocinética do tramadol em plasma caprino	31
Figura 06	Distribuição das concentrações do tramadol ao longo do tempo, seguindo o modelo bicompartimental, para as doses de 2 e 4 mg.kg ⁻¹	31

Capítulo 02

Figura 01	Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol e seu metabólito M1 em plasma caprino, obtido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas	49
Figura 02	Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol (verde) e seus metabólitos M1 (preto), M2 (rosa) e M3 (azul) em plasma caprino, obtido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas	49

Figura 03	Distribuição das concentrações plasmáticas do tramadol e O-desmetiltramadol (M1) ao longo do tempo, após administração por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1}	50
-----------	---	----

Capítulo 03

Figura 01	Espectro de massas íon precursor e íon filho do tramadol (264/58) apresentado em A e O-desmetiltramadol (250/58), apresentado em B.	66
Figura 02	Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol e seu metabólito M1 em plasma caprino, com respectivos tempos de retenção (A) e cromatograma contendo picos do tramadol (verde) e seus metabólitos M1 (preto), M2 (rosa) e M3 (azul) obtido por meio de LCMS	67
Figura 03	Representação esquemática do modelo aberto de dois compartimentos (A), utilizado para tramadol e do modelo de um compartimento (B), utilizado para O-Desmetiltramadol	68
Figura 04	Distribuição das concentrações plasmáticas do tramadol ao longo do tempo, após sua administração por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1}	68
Figura 05	Distribuição das concentrações plasmáticas do O-desmetiltramadol (M1) ao longo do tempo, após administração do tramadol por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1}	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo 01

Tabela 01	Escala de dor para avaliação da analgesia	24
Tabela 02	Valores de média $\pm$ desvio padrão dos escores de dor atribuídos aos grupos controle, 2 e 4 mg.kg ⁻¹ de tramadol intravenoso em caprinos submetidos à orquiectomia	28
Tabela 03	Valores de média e desvio padrão do tempo decorrido entre a administração do tratamento e a aplicação da medicação resgate, nos três grupos: controle (n = 8), 2 mg (n = 6) e 4 mg (n = 8)	28
Tabela 04	Valores do ensaio de precisão para concentrações alta (20 µg.ml ⁻¹) média (2 µg.ml ⁻¹) e baixa (0,25 µg.ml ⁻¹) do tramadol obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência	29
Tabela 05	Parâmetros farmacocinéticos do tramadol após administração intravenosa em caprinos, nas doses de 2 e 4 mg.kg ⁻¹ . Dados expressos em média e desvio padrão	29
Tabela 06	Parâmetros farmacocinéticos do tramadol após administração intravenosa em caprinos, nas doses de 2 e 4 mg.kg ⁻¹ . Dados expressos em média e desvio padrão	31

Capítulo 02

Tabela 01	Parâmetros farmacocinéticos do tramadol e M1 após administração intravenosa e intramuscular em caprinos, na dose de 4 mg.kg ⁻¹ . Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação	49
-----------	---	----

Capítulo 03

Tabela 01	Parâmetros farmacocinéticos derivados da análise de dois compartimentos do tramadol, após sua aplicação intramuscular e intravenosa em caprinos. Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação	70
Tabela 02	Parâmetros farmacocinéticos derivados da análise monocompartimental do O-desmetiltramadol. Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação ..	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	CAPÍTULO 1 – EFEITOS CLÍNICOS E FARMACOCINÉTICA DE DIFERENTES DOSES DO TRAMADOL EM CAPRINOS SUBMETIDOS A ORQUIECTOMIA	20
	INTRODUÇÃO	22
	MATERIAL E MÉTODOS	23
	Avaliação da analgesia	23
	Análise farmacocinética	25
	RESULTADOS	27
	Avaliação da analgesia	27
	Análise farmacocinética	29
	DISCUSSÃO	32
	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	37
4	CAPÍTULO 02 - BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA DO TRAMADOL INTRAMUSCULAR EM CAPRINOS	42
	INTRODUÇÃO	44
	MATERIAIS E MÉTODOS	45
	Animais	45
	Delineamento experimental	46
	Padrões e produtos químicos	46
	Instrumentação e condições cromatográficas	46
	Preparo das amostras	47
	Análises farmacocinéticas	47
	RESULTADOS	48
	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
5	Capítulo 03 – FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL E O- DESMETILTRAMADOL EM CAPRINOS, APÓS ADMINISTRAÇÃO	

	INTRAVENOSA E INTRAMUSCULAR	61
	INTRODUÇÃO	63
	MATERIAL E MÉTODOS	64
	RESULTADOS	66
	DISCUSSÃO	71
	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

A dor é considerada o quinto sinal vital e deve ser adequadamente tratada já que promove diversas alterações deletérias ao organismo (SHAVIT; FRIDEL; BEIL, 2006; ANDERSON; MUIR, 2005). Por ser uma experiência complexa e multidimensional, nenhum parâmetro simples é patognomônico para a sua identificação, entretanto, o seu reconhecimento é o primeiro passo para a instituição de terapia adequada. Durante avaliação da dor, são observados alterações comportamentais e modificações nas funções vitais como aumento nas frequências cardíaca e respiratória, pressão arterial, além da elevação nas concentrações plasmáticas de glicocorticoides, catecolaminas, hormônio adrenocorticotrófico e fator liberador de corticotrofina (FITZPATRICK; SCOTT; NOLAN, 2006).

Após identificação, a dor deve ser prontamente tratada e as estratégias de tratamento nos pequenos ruminantes devem contemplar eficácia analgésica e viabilidade econômica, além de considerar especialmente a intensidade e duração do estímulo doloroso bem como as características do fármaco (NEWTON; O'CONNOR, 2013; PLUMMER; SCHLEINING, 2013).

Apesar do avanço da Medicina Veterinária, na clínica de ruminantes em particular, há poucas pesquisas com medicamentos que promovam sua capacidade de promover o alívio da dor e demonstram as concentrações plasmáticas dos fármacos mínimas eficazes, necessárias para promover analgesia. De maneira geral, as doses administradas nesses animais são extrapoladas das prescritas para o homem ou animais de companhia, o que pode não propiciar ou refletir a concentração da droga necessária para analgesia em pequenos ruminantes, uma vez que existem marcantes diferenças fisiológicas entre as espécies (NEWTON; O'CONNOR, 2013; PLUMMER; SCHLEINING, 2013). A partir disto, torna-se fundamental a realização de estudos que comprovem a atividade analgésica e determinem a dose do fármaco nos pequenos ruminantes.

O cloridrato de tramadol é um fármaco opioide atípico, com ação analgésica decorrente da interação com receptores opioides e não opioides, o que promove ativação central dos mecanismos inibitório da dor (YANARATES et al., 2010). É estruturalmente semelhante à codeína, sendo formado por dois enantiômeros, que contribuem para os seus efeitos antinociceptivos de formas distintas (BUDD, 1999; MYERS, 2005; GIORGI et al.,

2007). A grande vantagem do tramadol é que diferentemente dos demais opioides agonistas, promovem poucas alterações cardiorrespiratórias, constipação ou sedação (BALLANTYNE, 1998).

A utilização do tramadol na rotina clínica dos animais de produção é restrita, apesar do conhecimento sobre os efeitos analgésicos e a segurança do opioide, especialmente no homem e nos pequenos animais. Isto ocorre em virtude da falta de estudos demonstrando a eficácia analgésica do fármaco nestes animais, determinando a atividade antinociceptiva, sua farmacocinética e farmacodinâmica após a administração para o alívio da dor (CUNHA, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos clínicos, farmacocinética e biodisponibilidade do tramadol em caprinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a eficácia analgésica do tramadol nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ intravenoso, em caprinos submetidos a orquiectomia;

Validar metodologia analítica e bioanalítica para determinação do tramadol e o seu metabólito O-desmetiltramadol em plasma caprino;

Determinar os parâmetros farmacocinéticos do tramadol e O-desmetiltramadol após administração intravenosa e intramuscular, na dose de 4 mg.kg⁻¹;

Determinar a biodisponibilidade absoluta do tramadol em caprinos, após aplicação do opioide pelas vias intravenosa e intramuscular, na dose de 4 mg.kg⁻¹.

3. CAPÍTULO 01 – EFEITOS CLÍNICOS E FARMACOCINÉTICA DE DIFERENTES DOSES DO TRAMADOL EM CAPRINOS SUBMETIDOS A ORQUIECTOMIA

Clinical and pharmacokinetic effects of different doses of tramadol in goats subjected to
orchietomy

Artigo submetido ao periódico
RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

Efeitos clínicos e farmacocinética de diferentes doses do tramadol em caprinos submetidos a orquiectomia

RESUMO - Objetivou-se comprovar a eficácia analgésica e determinar a farmacocinética de 2 e 4 mg.kg⁻¹ do tramadol em caprinos, submetidos a orquiectomia. Vinte e três caprinos adultos foram randomicamente distribuídos em três grupos: 7 animais receberam 2 mg.kg⁻¹ de tramadol, 8 animais receberam 4 mg.kg⁻¹; e no grupo controle, 8 caprinos receberam 5 ml de NaCl 0.9%, todos por via intravenosa. Realizou-se infiltração local de lidocaína e os animais foram castrados. A avaliação da analgesia foi realizada a partir do pós-operatório imediato e em 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 horas após administração, por meio de uma escala de dor. Nos animais que apresentaram dor, o resgate analgésico foi realizado com cetoprofeno. Em todos os grupos, amostras de sangue venoso foram colhidas para determinação da farmacocinética, em 5, 15, 30, 45 minutos, e 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16 e 24 horas após aplicação do tratamento. A administração de tramadol não resultou em excitação, sedação ou qualquer outro efeito adverso. Os animais tratados com tramadol demonstraram menores escores de dor quando comparado ao grupo controle e somente necessitaram de analgesia resgate em 6,7±1,8 h para o grupo 2 mg e 8,0±1,8 h para o grupo 4mg, enquanto que os do grupo controle, o cetoprofeno foi requerido em 2,8±1,8 h. Quanto aos parâmetros farmacocinéticos, não houve diferença significativa entre as doses. O tramadol demonstrou rápida metabolização e decaimento, especialmente na maior dose, o que pode estar relacionado a formação de maiores quantidades de metabólito ativo. O tramadol mostrou-se seguro e eficaz para o controle da dor na orquiectomia da espécie caprina. Sugere-se as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ por via intravenosa, a cada 6 e 8 horas, respectivamente para a espécie caprina. A farmacocinética do tramadol deu suporte a avaliação clínica para determinação da dose e intervalo de administração em caprinos.

PALAVRAS-CHAVE: Analgesia. Nocicepção. Dor pós-operatória. Ruminantes.

ABSTRACT.- The aim of this study was to compare the analgesic efficacy and pharmacokinetics of 2 and 4 mg.kg⁻¹ of tramadol applied to goats submitted to orchietomy. Twenty-three adult goats were randomly assigned into three groups: 7 animals received 2 mg.kg⁻¹ of tramadol, 8 animals received 4 mg.kg⁻¹; and 8 goats in the control group received 5 ml of 0.9% NaCl, all intravenously. Local lidocaine infiltration was performed and the animals were then castrated. Analgesia evaluation was performed through a pain scale from the immediate postoperative period and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 and 24 hours after administration. Analgesic rescue was performed with ketoprofen in animals that presented pain. Venous blood samples were collected from all groups to determine pharmacokinetics at 5, 15, 30, 45 minutes, and at 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16 and 24 hours after treatment application. Tramadol administration did not result in excitation, sedation nor any other adverse effects. Animals treated with tramadol showed lower pain scores when compared to those in the control group; those that required analgesic rescue occurred at 6.7±1.8 h for 2 mg group, and 8.0±1.8 h for the 4mg group, whereas ketoprofen was required at 2.8±1.8 h in the control group. No significant difference between doses was found regarding pharmacokinetic parameters. Tramadol showed rapid metabolism and decay with a short half-life. Tramadol has been shown to be safe and effective for controlling pain in caprine orchietomy. Intravenous doses of 2 and 4 mg.kg⁻¹ are suggested every 6 and 8 hours, respectively. In this study, tramadol pharmacokinetics supported the clinical evaluation for dose determination and administration interval in goats.

KEUWORDS: Analgesia. Nociception. Postoperative pain. Ruminants.

INTRODUÇÃO

O cloridrato de tramadol é um analgésico de ação central considerado opioide atípico, por apresentar duplo mecanismo de ação: interação fraca com os receptores opioides μ e inibição na recaptação de noradrenalina e serotonina (HABIBIAN et al., 2011), desta forma bloqueia os impulsos na medula espinhal por ação mista. Difere dos demais opioides agonistas por promover poucas mínimos efeitos respiratórios, cardiovasculares e gastrointestinais tanto em humanos quanto em animais (SCOTT & PERRY, 2000; KUKANICH & PAPICH, 2004; VETTORATO et al., 2010; CAGNARDI et al., 2011; PAOLOZZI et al. 2011), sendo comumente prescrito para tratamento da dor considerada de grau leve a moderada e apresenta ação analgésica para dor somática e visceral (BLOOR et al., 2012). Em humanos, após administração do tramadol, a analgesia clínica é observada em concentrações plasmáticas entre 100 e 300 ng.ml⁻¹, com um período hábil de até 8 horas (CURTICAPEAN et al., 2008).

O uso do tramadol em cães e gatos foi descrito em diferentes vias de administração, doses, indicações clínicas e experimentais, produzindo nestas espécies analgesia significativa associada a estabilidade nos parâmetros hemodinâmicos e cardiorrespiratórios (MASTROCINQUE; FANTONI, 2003; CAGNARDI et al., 2011). Apesar do conhecimento sobre os efeitos analgésicos e segurança do tramadol em cães, sua utilização em animais de produção ainda é pouco relatada, já que são escassos os estudos que determinam a dose e comprovam a eficácia analgésica do fármaco nestes animais.

No que diz respeito aos caprinos, o uso do tramadol encontra-se em estudos experimentais, nos quais a droga quando utilizada por via epidural, demonstrou analgesia durante 47±13 minutos após castração utilizando anel de borracha (AJADI et al., 2012) e 235±18 minutos de efeito antinociceptivo, quando avaliado por pinçamento (DEHKORDI et al., 2012). Por via sistêmica, a eficácia analgésica do medicamento em caprinos não foi comprovada. Ainda na espécie, Sousa et al. (2008) realizaram um estudo de biodisponibilidade absoluta administrando o fármaco por via intravenosa e oral, na dose de 2 mg.kg⁻¹. Os resultados demonstraram que o tramadol e seu metabólito apresentaram concentrações plasmáticas insuficientes para promover analgesia quando administrado por via oral enquanto que por via intravenosa, as concentrações acima de 100 ng.ml⁻¹ permaneciam por curto período de tempo, tendo os autores sugerido, apesar de não terem realizado estudo clínico, que a dose deveria ser no mínimo dobrada para que concentrações compatíveis com analgesia pudessem ser evidenciadas.

Considerando estes aspectos, objetivou-se comparar a eficácia analgésica e a farmacocinética de 2 e 4 mg.kg⁻¹ do tramadol em caprinos, submetidos a orquiectomia.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA-UFERSA parecer nº 04/2013). Foram utilizados 23 caprinos (*Capra hircus*), adultos, pesando em média 40 kg, machos, sem padrão racial definido, considerados saudáveis mediante avaliação física e exames complementares de hemograma completo e avaliação bioquímica da função renal e hepática.

Previamente ao dia do experimento, os caprinos foram submetidos à restrição alimentar de 24 horas e hídrica de 12 horas, voltando a fornecer 4 horas após a administração do tratamento. Os animais foram distribuídos de forma randômica em três grupos experimentais, em estudo duplo cego: Grupo 2 mg, sete caprinos receberam tramadol por via intravenosa, na dose de 2 mg.kg⁻¹; Grupo 4 mg, em oito animais foi aplicado tramadol na dose de 4 mg.kg⁻¹ pela mesma via e Grupo Controle, onde oito animais receberam 5 mL de NaCl 0,9% também por via intravenosa. Em todos os grupos, o tratamento foi diluído em solução de NaCl 0,9% até completar o volume total de 5 mL para que o avaliador não soubesse o tratamento que estava sendo utilizado.

Passados 50 minutos da administração do tratamento, foi aplicado 7 mg.kg⁻¹ de lidocaína sem vasoconstrictor, no subcutâneo ao longo do cordão espermático e na porção distal da bolsa escrotal e, passados 10 minutos, os caprinos foram submetidos à orquiectomia. Salienta-se que os procedimentos cirúrgicos foram realizados seguindo a mesma técnica e sempre realizadas pelo mesmo cirurgião. No pós-operatório imediato, os caprinos receberam penicilina, 30.000UI.kg⁻¹, por via intramuscular, sendo administrada novamente com 48 horas.

Avaliação da analgesia

Os animais foram avaliados quanto ao comportamento e parâmetros vitais, atribuindo pontuação de acordo com a resposta frente a determinados estímulos, e alteração nos valores basais dos parâmetros físicos (Tabela 01), de acordo com escala de dor de Adami et al. (2011) utilizada em caprinos. A escala de dor incluiu as seguintes categorias: uma escala de

classificação numérica, comportamentos gerais, comportamentos interativos e parâmetros fisiológicos (FC e FR).

Para a escala de classificação numéricas (ECN), o observador estimou o grau de dor ao atribuir uma pontuação, variando de 0 a 3, com 0 sendo nenhuma dor e 3 sendo dor intensa.

A avaliação do comportamento geral foi realizada utilizando um sistema binário, observando a presença ou ausência dos seguintes comportamentos: postura anormal, frequente mudança de postura, vocalização, ranger dos dentes, expressão facial dolorosa, letargia ou depressão. Para cada um desses comportamentos, quando estiveram presentes, a pontuação de 1 foi atribuída, e quando o comportamento não foi observado, pontuou-se com 0.

No comportamento interativo, 0 indicou comportamento normal e a pontuação de 3 indicou a maior mudança no comportamento (0, alerta e responsivo, 1, se aproxima após de duas chamadas; 2, aproxima-se após quatro chamadas; 3, nenhuma reação, não se aproxima quando chamado ou é agressivo). Para os parâmetros fisiológicos, 0 significou ausência ou alterações mínimas na FC e FR (alterações <10% do valor basal), 1 indicou um aumento de 11-30% no valor basal do parâmetro; 2, um aumento de 31-50%; e 3, um aumento de mais de 50%, em comparação com valores pré tratamento. A soma dos escores resultantes destas três categorias foi definida como escore total de dor.

Cetoprofeno, 2 mg.kg⁻¹ por via intravenosa foi administrado como analgesia resgate, caso os animais apresentassem escore total de dor acima de 8.

Tabela 01 – Escala de dor para avaliação da analgesia

	Escore
Escala de classificação numérica	
Sem dor	0
	1
	2
Dor intensa	3
Comportamentos gerais	
Postura anormal	1
Frequente mudança de postura	1
Vocalização	1
Ranger dos dentes	1
Expressão facial dolorosa	1
Letargia ou depressão	1
Comportamento interativo	
Alerta e responsivo	0
Se aproxima após de duas chamadas;	1
Aproxima-se após quatro chamadas;	2

Nenhuma reação, não aproxima-se quando chamado ou é agressivo	3
Parâmetros fisiológicos - FC	
Alteração <10% do valor basal	0
Alteração de 11-30% no valor basal	1
Alteração 31-50% do valor basal	2
Alteração acima de 50% do valor basal	3
Parâmetros fisiológicos - FR	
Alteração <10% do valor basal	0
Alteração de 11-30% no valor basal	1
Alteração 31-50% do valor basal	2
Alteração acima de 50% do valor basal	3
Somatório total	18

As avaliações foram feitas do pós-operatório imediato até 24 horas da aplicação do tratamento, nos seguintes momentos: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16 e 24 horas após administração do tramadol ou NaCl 0,9%, realizadas sempre pelo mesmo observador que não tinha conhecimento do tratamento administrado.

A análise estatística foi realizada através do programa Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Para avaliar diferenças estatísticas das médias entre grupos dentro de cada tempo e tempos dentro de cada grupo, após análise dos pressupostos paramétricos, utilizou-se Kruskal-Wallis seguido por Dunn e Friedman respectivamente. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Análise farmacocinética

Para determinação da concentração plasmática de tramadol e as variáveis farmacocinéticas, foram coletados 3 mL de sangue venoso de todos os animais. A amostra foi acondicionada em tubos contendo EDTA, centrifugada a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, o qual foi mantido a -80 °C para posterior análise. As coletas de sangue foram feitas nos momentos 0 (antes da administração do tramadol) e aos que se seguem em 5, 15, 30, 45 minutos e 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16 e 24 horas após administração.

As concentrações plasmáticas de tramadol foram analisadas por meio de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC modelo Varian ProStar (Varian, EUA), incluindo bomba quaternária (ProStar modelo 240), autoinjeter (ProStar modelo 410), detector de comprimento de onda variável PDA (ProStar modelo 335) e compartimento de duas colunas termostatizado.

O método utilizado foi baseado na metodologia previamente publicada para determinação do fármaco em caprinos (SOUSA et al., 2008) com modificações feitas para se

adequar as condições dos equipamentos do laboratório, sendo validado com base nos critérios descritos na resolução da ANVISA nº899, de 29 de maio de 2003 e do International Conference on Harmonisation (ICH, Q8R1).

As separações cromatográficas foram feitas utilizando coluna ACE C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, ECA, EUA), acoplada a uma pré-coluna RP ACE (4 mm x 4,6 mm, 5 µm, ECA, EUA) C-18 com tamanho de partícula de 5 µm (Columbia, MD, EUA), mantido a temperatura ambiente (25 °C). A eluição das amostras ocorreu através de fluxo isocrático de tampão fosfato 0,015 M e acetonitrila (82:18), o pH foi ajustado para 3 utilizando ácido fosfórico. O fluxo da fase móvel foi de 1,5 ml/min, com volume de injeção de 20 µL. Ajustou-se o detector ultravioleta para operar em comprimento de onda fixo em 220 nm. As varreduras dos cromatogramas foram realizadas na região do espectro de 200 a 400 nm. Como padrão interno, utilizou-se solução padrão de secnidazol na concentração de 10 µg/mL. A integração da área dos picos e do padrão interno foi realizada no software Galaxie Chromatography Data System versão 1.9.302.530. Através deste software foi possível analisar a pureza dos picos através do cálculo do índice de similaridade entre o fármaco presente na solução padrão e o fármaco presente nas amostras coletadas.

Quanto ao preparo das amostras, os plasmas dos animais foram descongelados naturalmente e posteriormente foram agitados em vortex antes do processo de extração. Em seguida foi realizada a extração líquido-líquido em que, a 500 µL de plasma foram adicionados 50 µL de solução de secnidazol, 100 µL de solução de hidróxido de sódio 0,25 M. essa mistura foi agitada, em vortex durante 30 segundos. Então, adicionou-se 3 mL de tert-Butyl methyl ether e o plasma foi centrifugado a 2500 G, à 4 °C, durante 10 min, sendo em seguida retirada a fase orgânica a qual foi colocada em banho maria (40°C) e secada com nitrogênio gasoso. Posteriormente, a amostra foi reconstituída com 250 µL da fase móvel, filtradas em membranas de nylon com 0,45 µm de tamanho de poro e injetadas no HPLC.

Após o processamento de todas as amostras, os dados foram analisados de acordo com um modelo aberto de dois compartimentos, utilizando software WinNonlin (Pharsight Co., CA, versão 6.3). A concentração plasmática extrapolada para o tempo 0 (C_p^0) foi obtido diretamente da observação dos dados. O volume de distribuição foi calculado, sendo o resultado da divisão da quantidade de tramadol injetado pela concentração plasmática do medicamento. O $t_{1/2}$ foi o valor obtido substituindo a fórmula $0.693/K_e$. O Clearance foi calculado seguindo a fórmula $Cl = k \cdot V_d / t_{1/2}$.

Utilizou-se análise de variância (ANOVA) após transformação dos dados para seus valores logarítmicos (ln). Usando a variância do erro (S²), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) foram calculados.

RESULTADOS

A administração do tramadol em ambas as doses, não resultou em aparecimento de efeitos adversos bem como alterações deletérias nas funções cardiovasculares e respiratórias, houve manutenção dos valores normais de frequência cardíaca, respiratória, pressão arterial e temperatura.

Avaliação da analgesia

Os valores de média e desvio padrão dos escores de dor dos caprinos nos três grupos: controle, 2 mg e 4 mg, são apresentados no quadro 02, e o tempo decorrido, em horas, entre a administração do tratamento e aplicação do resgate nos diferentes grupos está representado no quadro 04.

Observou-se que o tramadol em ambas as doses conferiu analgesia. Os escores de dor nos animais tratados com o opioide foram menores, especialmente no pós-operatório imediato, e a aplicação da medicação resgate foi requerida mais tardiamente do que no grupo controle (Tabela 02 e 03).

No grupo controle, sinais de dor já puderam ser evidenciados em apenas uma hora após administração da solução fisiológica, sendo requerido em 2 deles, a aplicação da medicação resgate neste momento, enquanto que os tratados com tramadol não exibiam ao exame físico assim como na avaliação comportamental, características de desconforto para este momento (Tabela 02 e 03).

Em média, o grupo controle recebeu analgesia resgate em $2,8 \pm 1,8$ horas após tratamento e o tramadol propiciou analgesia por $6,7 \pm 1,8$ horas e $8,0 \pm 3,7$ horas, nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ respectivamente.

Tabela 02 – Valores de média $\pm$ desvio padrão dos escores de dor atribuídos aos grupos controle, 2 e 4 mg.kg⁻¹ de tramadol intravenoso em caprinos submetidos à orquiectomia.

Momento de avaliação	Controle	2mg	4mg
1h	9,0 $\pm$ 0,0A n = 8	0 $\pm$ 0,0 n = 6	0 $\pm$ 0,0 n = 8
2h	7,6 $\pm$ 1,3aA n = 6	4,0 $\pm$ 3,2bB n = 6	3,5 $\pm$ 1,7bB n = 8
4h	8,3 $\pm$ 1,5aA n = 3	6,4 $\pm$ 1,9aAB n = 6	6,6 $\pm$ 2,3aA n = 8
6h	9,0 n = 1	8,5 $\pm$ 1,2aA n = 4	7,2 $\pm$ 1,3aA n = 6
7h	-	8,5 $\pm$ 2,1aA n = 2	6,7 $\pm$ 0,9aA n = 4
8h	-	8,0 n = 1	7,7 $\pm$ 1,2A n = 4
9h	-	9,0 n = 1	8,0 $\pm$ 1,7A n = 3
10h	-	-	7 n = 1
12h	-	-	8 n = 1
16h	-	-	12 n = 1
24h	-	-	-

^{a,b} Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística na linha. (P<0.05); ^{A,B} Letras maiúsculas diferentes significa diferença estatística na coluna (P<0.05).

Tabela 03 – Valores de média e desvio padrão do tempo decorrido entre a administração do tratamento e a aplicação da medicação resgate, nos três grupos: controle (n = 8), 2 mg (n = 6) e 4 mg (n = 8).

Controle		2 mg		4 mg	
Animal	Resgate (h)	Animal	Resgate (h)	Animal	Resgate (h)
1	1	9	4	15	4
2	1	10	6	16	6
3	2	11	6	17	6
4	2	12	7	18	6
5	2	13	8	19	8
6	4	14	9	20	9
7	4			21	9
8	6			22	16
Média	2,8		6,7		8,0
Desvpad	1,8		1,8		3,7

Análise farmacocinética

O método utilizado para determinação do tramadol em plasma caprino demonstrou linearidade, observando-se coeficiente de correlação (R^2) de 0,9983 e equação da reta de $y = 0,058x - 0,001$ (Figura 01). Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados em três concentrações: alta ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$), média ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e baixa ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 04 e 05). Os desvios (%) apresentados encontram-se dentro do permitido pela legislação brasileira e pelo ICH. As condições experimentais permitiram obter percentual de recuperação de 99,92% e 97,79% para o tramadol e secnidazol.

Figura 01 – Representação gráfica da curva padrão de tramadol em plasma caprino, obtido por meio de CLAE.

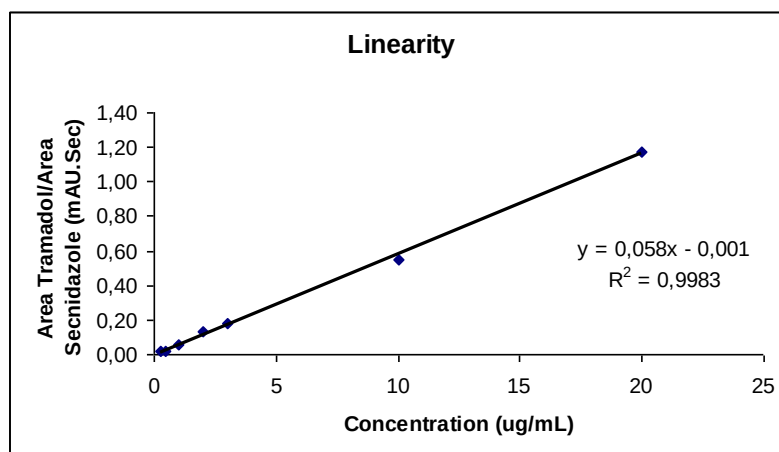


Tabela 04 – Valores do ensaio de precisão para concentrações alta ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) média ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e baixa ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do tramadol obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

	Área TRAMADOL/SECNIDAZOL ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Tramadol ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tramadol ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tramadol ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$)
Média	1,101281	0,114531	0,01781
Desvio Padrão	0,069464	0,015102	0,002412
DPR%	6,3076	13,18608	13,54048

Tabela 05 – Ensaio de exatidão para concentrações alta ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) média ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e baixa ($0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do tramadol obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

ÁREA TRAMADOL	ÁREA SECNIDAZOL	TRA/SEC	CONC. teórica	Concen. Experimental	% Exatidão
1202,1	1160	1,04	20	17,88436	89,42182
1318,6	1122,7	1,17	20	20,26707	101,3354
1215,7	1112,2	1,09	20	18,86308	94,31541

110	1019	0,11	2	1,878431	93,92153
121,5	921,8	0,13	2	2,289782	114,4891
98,5	948,6	0,10	2	1,807539	90,37693
9,1	587,6	0,02	0,25	0,284254	113,7016
9,3	458,1	0,02	0,25	0,367263	146,9051
8,01	454	0,02	0,25	0,321434	128,5736

Quanto a seletividade, os espectros obtidos em quatro pontos do pico no cromatogramas do tramadol, foram semelhantes (Figura 02). Observou-se pureza de pico de 999,4 quando foi calculado o índice de similaridade do tramadol em plasma e do tramadol existente na biblioteca de padrões, além disto, em visão tridimensional, verificou-se absorção do tramadol, sem interferentes (Figura 03). Por meio desta metodologia, o tramadol e o padrão interno, secnidazol, foram eluídos com tempo de retenção de 5 e 2,7 minutos, respectivamente (Figura 04) e o limite de quantificação foi de $0,25\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 02 – Espectro de absorção do tramadol obtido em quatro diferentes pontos do pico.

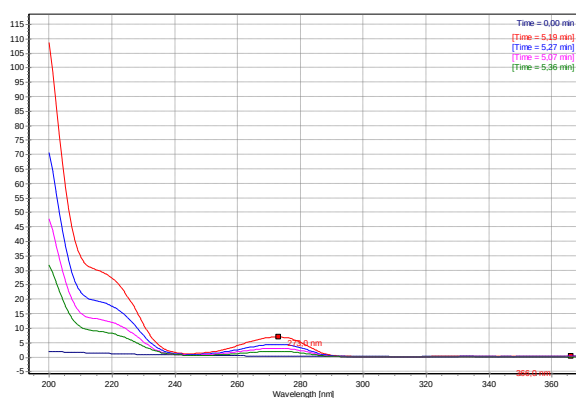


Figura 03 – Visualização tridimensional do espectro do tramadol em plasma caprino, demonstrando não haver interferência dos outros componentes da matriz biológica.

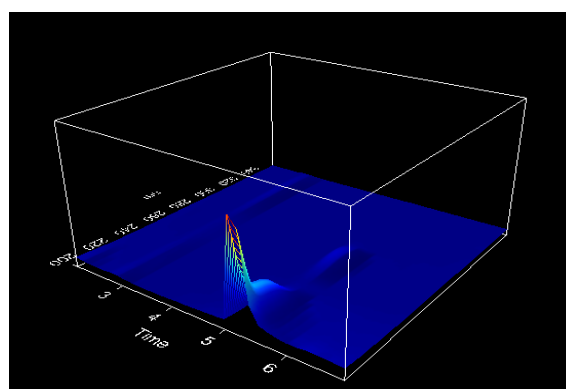


Figura 04 - Cromatograma em que são evidenciados os picos do tramadol e padrão interno, secnidazol, em plasma caprino, obtido por meio de CLAE.

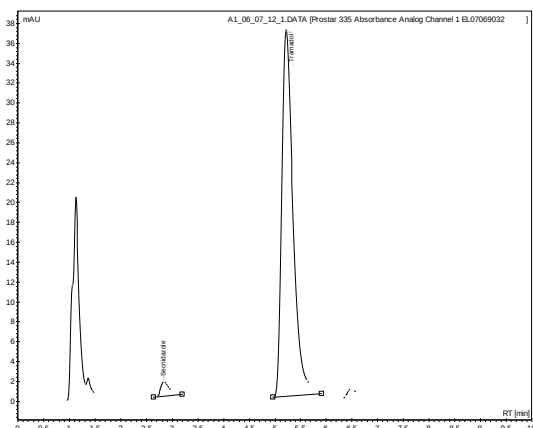
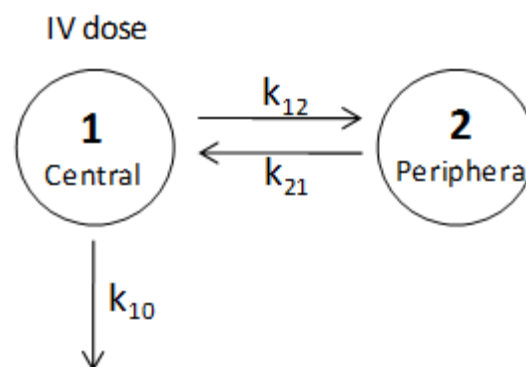


Figura 05 – Representação esquemática do modelo aberto de dois compartimentos para descrever a farmacocinética do tramadol em plasma caprino



O modelo aberto de dois compartimentos (Figura 05) foi o que melhor descreveu as concentrações plasmáticas do tramadol em ambas as doses. A distribuição das concentrações do tramadol ao longo do tempo, seguindo modelo bicompartimental, para as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ está representado na figura 06. Os parâmetros farmacocinéticos (média ± erro padrão) do tramadol, administrado nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ em caprinos estão apresentados na tabela 06. Não houve diferença significativa entre os grupos nessas variáveis.

Figura 06 – Distribuição das concentrações do tramadol ao longo do tempo, seguindo o modelo bicompartimental, para as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹.

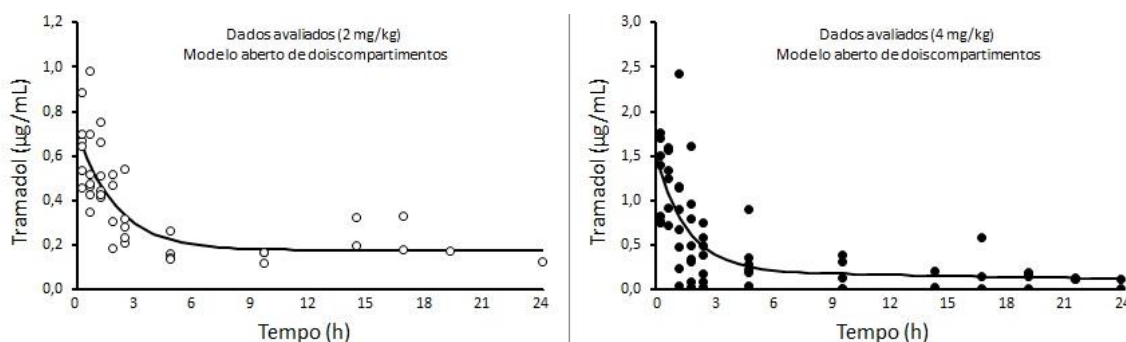


Tabela 06 – Parâmetros farmacocinéticos do tramadol após administração intravenosa em caprinos, nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹. Dados expressos em média e desvio padrão.

Parâmetro	Dose intravenosa	
	2 mg/kg	4 mg/kg

	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
C_p^0	0,8305	0,1322	1,4789	0,3235
K_{10} (h^{-1})	0,0692	0,0521	0,1539	0,0644
K_{12} (h^{-1})	1,1250	0,2555	1,1684	0,2801
K_{21} (h^{-1})	0,3601	0,0865	0,2082	0,0588
Cl(L/h*kg)	0,1778	0,1419	1,0613	0,1419
Vd (L/kg)	2,6533	0,3879	2,8817	0,4972
Vss (L/kg)	11,6799	1,5245	23,0240	1,5245
$T_{1/2}$ (h)	0,28327	0,21686	0,34196	0,23954

C_p^0 – Concentração plasmática extrapolada no tempo 0; K_{10} , K_{12} – constantes de equilíbrio intercompartimental; K_{21} – constante de eliminação; Cl – Clearance; Vd – Volume de distribuição; Vss – Volume de distribuição no estado de equilíbrio dinâmico; $T_{1/2}$ - tempo de meia vida de eliminação; L – Litro; h – Hora; kg – quilograma.

DISCUSSÃO

O tramadol é amplamente utilizado em humanos bem como na rotina da clínica de pequenos animais (MASTROCINQUE; FANTONI, 2003; CAGNARDI et al., 2011). Apesar do conhecimento do efetivo poder analgésico nas espécies domésticas, não há estudos que determinam a dose sistêmica clinicamente eficaz para a prevenção e tratamento da dor nos caprinos, e os efeitos clínicos e comportamentais resultantes da sua administração na espécie, sendo esta pesquisa pioneira nestes aspectos.

Avaliação da analgesia

A administração do opioide nos caprinos não resultou em efeitos adversos como salivação intensa, tremor muscular, constipação, timpanismo ou alterações deletérias nas funções cardiovasculares e respiratórias. Desta forma, o fármaco mostrou-se seguro, confirmando os resultados anteriormente relatados para caprinos (SOUSA et al., 2008; AJADI et al. 2012, DEHKORDI et al. 2012), cães (MASTROCINQUE; FANTONI, 2003; VETTORATO et al., 2010; PAOLOZZI et al. 2011), asininos (GIORGI et al., 2009) e cavalos (DHANJAL et al., 2009).

Apesar da dificuldade em avaliar a dor nos ruminantes ser bem descrita, a escala de dor utilizada no estudo (ADAMI et al., 2011) mostrou-se eficaz, pois aliou análise subjetiva comportamental, avaliando comportamentos gerais e interativos, com achados objetivos do exame físico, como aumento nas frequências cardíaca, respiratória, o que possibilitou avaliação e determinação do escore de dor apresentado pelos caprinos.

Neste estudo, utilizou-se como estímulo doloroso a orquiectomia. Optou-se por este estímulo por representar de forma específica a dor, tendo os animais sido submetidos a situação clínica-cirúrgica em que o emprego e a eficácia do analgésico faz-se necessária. Embora alguns estudos utilizem outros meios para representar estímulos dolorosos, como transdutores térmicos, estímulos elétricos, químicos ou mecânicos (VARCOE-COCKS et al., 2006; DHANJAL et al., 2009), estes métodos são limitados, uma vez que não promovem resposta fidedigna às encontradas quando um estímulo específico doloroso é aplicado.

As doses utilizadas nesta pesquisa foram baseadas em estudo anterior em caprinos realizado por SOUSA et al., 2008, no qual foi realizado a farmacocinética do tramadol intravenoso e oral. Apesar dos autores não terem realizado avaliação clínica da eficácia analgésica do opioide, sugeriram com base na concentração plasmática do tramadol e seu metabólito, que a dose de 2 mg.kg⁻¹ intravenoso poderia promover período hábil curto, além disto, relataram que a dose deveria ser no mínimo dobrada para se obter a concentração plasmática mais elevada e por consequência, uma analgesia mais prolongada (durante 6 horas) pudesse ser evidenciada. Desta forma neste estudo, avaliou-se a farmacocinética de das doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ do tramadol por via intravenosa.

Este estudo é pioneiro em comprovar o efeito analgésico do tramadol em caprinos por via intravenosa nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹. O efeito antinociceptivo do tramadol já havia sido descrito pela via epidural (AJADI et al. 2012, DEHKORDI et al. 2012) no entanto, a comprovação da analgesia após aplicação endovenosa não havia sido relatada.

Essa eficácia analgésica é ainda enfatizada ao analisar os escores de dor dos animais do grupo controle, já que passados apenas 2 horas da aplicação do tratamento, a maior parte dos caprinos deste grupo havia necessitado de analgesia resgate, enquanto que aqueles tratados com tramadol, não exibiam sinais de dor e desconforto neste momento. Em média o AINE foi aplicado para o grupo controle em 2,8 ±1,8 h, sendo atribuído esse tempo de analgesia à lidocaína infiltrada localmente no cordão espermático e na linha de incisão, pois a necessidade do resgate ocorreu no momento em que culminava com o fim do período hábil de analgesia promovida pelo anestésico local (SKARDA; TRANQUILLI, 2013).

Quanto ao tempo de analgesia promovido pelo tramadol, observou-se que as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ proporcionaram alívio da dor durante 6,7±1,8 e 8,0±3,7 horas, respectivamente. Este tempo de ação analgésica é semelhante ao relatado no homem e em cadelas, que varia de 6 a 8 horas (MASTROCINQUE; FANTONI, 2003; CURTICAPEAN et al., 2008). E é superior ao descrito para o fármaco, após aplicação de epidural em caprinos (235 ± 18 min),

cordeiros (318.6 ± 5.08 min), e bovinos (306.8 ± 8.58 min) (DEHKORDI; BIGHAM-SADEGH; GERAMI, 2012; HABIBIAN; BIGHAM; AALI, 2011; BANIADAM; AFSHAR; AHMADIAN, 2010).

Na medicina veterinária, apesar da grande utilização do tramadol na terapia analgésica principalmente de animais domésticos, não há estudos que determinem a concentração mínima eficaz (CME) do opioide necessária para que analgesia clínica seja promovida nas espécies animais. Em humanos, as pesquisas relatam ampla variabilidade entre os pacientes na concentração mínima eficaz, atribuído variação na metabolização do tramadol pelo citocromo P450 (STAMER et al., 2003). Apesar deste fato, admite-se que eficácia analgésica é observada enquanto são obtidas concentrações plasmáticas de 100 ng.ml^{-1} a 300 ng.ml^{-1} do tramadol (MALONNE et al., 2004; CURTICAPEAN et al., 2008). Na presente pesquisa, após aplicação do tramadol, a CME de 100 ng.ml^{-1} foi atingida durante 8 e 9 horas nos animais tratados com 2 e 4 mg.kg^{-1} do opioide.

Análise farmacocinética

O presente estudo confirma e amplia o conhecimento atual da cinética do tramadol, e demonstra os parâmetros farmacocinéticos do opioide administrado em caprinos na dose comprovada clinicamente eficaz. Além disto, ao aliar farmacocinética e farmacodinâmica, esta pesquisa revela importantes informações acerca do medicamento, o que confere maior segurança durante a escolha da droga, dose e intervalo de administração.

O método utilizado neste estudo para determinação e quantificação do tramadol em plasma caprino, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, foi baseado na metodologia publicada por Sousa et al. (2008). Após adequações e otimização, o método demonstrou facilidade, rapidez nas análises e quantificações acuradas.

Durante a validação da metodologia, a análise de 7 concentrações distintas para avaliação da linearidade demonstrou coeficiente de correlação adequado para determinação do opioide na matriz biológica, conforme especificações da norma brasileira (BRASIL, 2003) e internacional (ICH Q8R1). No que concerne a precisão e exatidão, o ensaio apresentou resultados dentro das especificações preconizadas pela ANVISA. Quanto a seletividade, não observou-se coeluição ou presença de qualquer interferente durante a identificação dos analitos. Deste modo, o método empregado demonstrou linearidade, especificidade, precisão e exatidão de acordo com a resolução da ANVISA nº 899 de 23 de maio de 2003.

As concentrações plasmáticas do tramadol ao longo do tempo foram melhor descritas por meio de um modelo de dois compartimentos. Para determinação deste modelo como sendo o que melhor adequava-se ao tramadol, realizou-se análise por meio do software de avaliação farmacocinética (WinNolin 6.3), com o método de Gauss-Newton, comparando o modelo de um e dois compartimentos. A partir dos resultados do critério de bondade e ajuste de Akaike, ficou definido que o de dois compartimentos melhor representava o comportamento das concentrações do tramadol ao longo do tempo.

Neste modelo, assume-se que o tramadol é administrado diretamente no compartimento central, representado pelos órgãos de maior perfusão e, de acordo com suas propriedades físico-químicas, há distribuição para o compartimento periférico (órgãos de menor perfusão). Ao atingir o equilíbrio e considerando seu clearance, segue um decaimento, sendo a droga, após distribuição, eliminada via compartimento central (FERNANDES; ISMAEL, 2006). O modelo farmacocinético bicompartimental utilizado neste estudo, também foi anteriormente descrito para representar a cinética do tramadol no organismo de caprinos (SOUSA et al., 2008), cães (KUKANICH; PAPICH, 2004; McMILLIAN et al., 2008), cavalos (DHANJAL et al., 2009) gatos (PYPENDOP; ILKIW, 2008) e camelos (ELGHAZALI et al., 2008).

O aumento na dose resultou em elevação na concentração plasmática, de modo que nos caprinos tratados com 2 e 4 mg.kg⁻¹, foram obtidos C_{0p} de 830 ng.ml⁻¹ e 1479 ng.ml⁻¹, respectivamente. Além disto, o tramadol foi detectável no plasma dos animais por 10 e 24 horas após aplicação da menor e maior dose do opioide. Em cães e cavalos quando submetidos administração de doses crescentes do tramadol observou-se também o incremento na concentração plasmática e no tempo de identificação do medicamento no plasma (McMILLIAN et al., 2008; KNYCH et al., 2013).

Altas concentrações do grupo 4 mg quando comparado ao 2 mg, foram evidenciadas até 1 hora após aplicação do tramadol. A partir deste momento, as concentrações em ambos grupos equiparam-se, sendo identificado valores semelhantes, o que sugere que com a maior dose, inicialmente ocorre intensificação na difusão pelas membranas e metabolização da droga, obedecendo os princípios da termodinâmica e as leis de Frick. Clinicamente, esses fatos comprovaram que tanto a dose de 2 e 4 mg.kg⁻¹ se equiparam em qualidade e tempo de analgesia.

Pesquisas indicam que a maior parte da analgesia promovida pelo tramadol advém do metabólito ativo (M1) (GIORGI et al., 2009). Após ação das enzimas do citocromo P450 no

fígado, diversos metabólitos foram identificados e apenas o metabólito M1 (O-desmethyltramadol) é ativo (HENNIES; FRIDERICH; SCHNEIDER, 1988) e responsável pela atividade analgésica do fármaco, por apresentar 2 a 4 vezes a potência analgésica e 200 vezes maior afinidade pelo receptor opióide μ do que a droga inalterada (DE LEO et al., 2009). Neste estudo, observou-se a rápida diminuição da concentração plasmática do tramadol e possivelmente consequente metabolização. Para o entendimento da analgesia e sua relação com a farmacocinética, os dados cinéticos deste metabólito seriam necessários, sendo esta uma limitação deste estudo.

Verificou-se curto tempo de meia vida do tramadol, de $0,28 \pm 0,2$ e $0,34 \pm 0,2$ horas para 2 e 4 mg.kg⁻¹, respectivamente, assemelhando-se ao anteriormente descrito para a espécie, em que após administração intravenosa de 2 mg.kg⁻¹ do opioide, meia vida de $0,31 \pm 0,01$ horas (SOUSA et al., 2008).

O tramadol, em ambas doses demonstrou alto volume de distribuição (Vd 2,65 e 2,88 L/kg, para as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹), o que denota ampla afinidade e distribuição pelos tecidos. Corroboram com este resultado, os dados obtidos para Vd do tramadol em caprinos (SOUSA et al., 2008), cavalos (DHANJAL et al., 2009; KNYCH et al., 2013), humanos (LEWIS; HAN, 1996), e cães (KUKANICH; PAPICH, 2004).

CONCLUSÕES

O tramadol mostrou-se seguro e eficaz para o controle da dor na orquiectomia da espécie caprina.

Sugere-se as doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ por via intravenosa, a cada 6 e 8 horas, respectivamente para a espécie caprina.

Na presente pesquisa, a farmacocinética do tramadol deu suporte a avaliação clínica para determinação da dose e intervalo de administração em caprinos.

Agradecimentos - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto nº 474936/2013-9.

REFERÊNCIAS

ADAMI, C., BERGADANO, A., BRUCKMAIER, RM., STOFFEL, MH., DOHERR, MG., SPADAVECCHIA, C. Sciatic-femoral nerve block with bupivacaine in goats undergoing elective stifle arthrotomy. **Veterinary Journal**, v. 188, p. 53–57, 2011.

AJADI, R. A. et al. Effect of epidural tramadol and lignocaine on physiological and behavioural changes in goats subjected to castration with a high tension band. **New Zealand Veterinary Association**, v. 60, n.6, p. 344-348, 2012.

BALLANTYNE, J. Tramadol: Its role in acute pain management. **Acute Pain, Amsterdam**, v. 1, n. 2, p. 5-6, 1998.

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

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

BRASIL. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2017.

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES

CAGNARDI, P., VILLA, R., ZONCA, A., GALLO, M., BECCAGLIA, M., LUVONI, GC., VETTORATO, E., CARLI S., FONDA, D., RAVASIO, G. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. **Research in Veterinary Science**, v.90, n. 3, p. 503–509, 2011.

CURTICAPEAN, A., MUNTEAN, D., CURTICAPEAN, M., DOGARU, M., VARI C., Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in human plasma. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1304-1312.

DEHKORDI, S.H.; BIGHAM-SADEGH, A.; GERAMI, R. Evaluation of anti-nociceptive effect of epidural tramadol, tramadol-lidocaine and lidocaine in goats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 39, n. 1, p.106-10, 2012.

DE LEO, M. et al. Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, n.2, p. 228-236, 2009.

DHANJAL, J. K. et al. Intravenous tramadol: effects, nociceptive properties, and pharmacokinetics in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 36, p. 581–590, 2009.

ELHAKIM, M. et al. Analgesic and antacid properties of i.m. tramadol given before Caesarian section under general anesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, p. 811–815, 2005.

FERNANDES, F., ISMAIL, PC., 2006. Conceitos farmacocinéticos fundamentais. In: CANGIANI, LM., POSSO, IP., POTÉRIO, G MB., NOGUEIRA, C.S. (Eds.), **Tratado de anestesiologia SAESP**. Vol 1. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, pp 207-218.

GIORGI, M, et al. Pharmacokinetics of Tramadol and Its Metabolites M1, M2, and M5 in Donkeys after Intravenous and Oral Immediate Release Single-Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n.7, p. 569-574, 2009.

HABIBIAN, S.; BIGHAM, A. S.; AALI, E. Comparison of lidocaine, tramadol and lidocaine–tramadol for epidural analgesia in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 434–438, 2011.

HENNIES, H. H.; FRIDERICHS, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, p. 877–880, 1988.

KUKANICH, B.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyiltramadol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 239-46, 2004.

KNYCH, H. K. et al. Pharmacokinetics and selected pharmacodynamic effects of tramadol following intravenous administration to the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 4, p. 490–496, 2013.

LEWIS, K. S.; HAN, N. H. Tramadol: A new centrally acting analgesic. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 54, n. 6, p. 643-652, 1997.

MALONNE, H. et al. Efficacy and tolerability of sustained-release tramadol in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the hip or knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 11, p. 1774-1782, 2004.

MASTROCINQUE, S.; FANTONI, D.T. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in bitches submitted to ovariohysterectomy. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.30, p.220-228, 2003.

McMILLIAN, C. J. et al. pharmacokinetics of intravenous tramadol in dog. Canadian journal of veterinary research, **Ottawa**, v. 72, n 4, p. 325-331, 2008.

PAOLOZZI, R. J. et al. Diferentes doses de tramadol em cães: ações analgésicas, sedativas e sobre o sistema cardiorrespiratório. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1417-1423, 2011.

PYPENDOP, B. H.; SIAO, K. T.; ILKIW, J.E. Effects of tramadol hydrochloride on the thermal threshold in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 12, p. 1465-1470, 2009.

SHARDA, R. T.; TRANQUILLI, W. J. **Anestésicos locais**. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. Lumb & Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária. 4 ed. São Paulo: Roca, 2013. p. 428-454.

SOUSA, A. B. et al. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyiltramadol in goats after intravenous and oral administration. **Journal veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 45-51, 2008.

STAMER, U. M. et al. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. **Pain**, v. 105, n. 1-2, p. 231-238, 2003.

VARCOE-COCKS, K. et al. Pressure algometry to quantify muscle pain in racehorses with suspected sacroiliac dysfunction. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n.6, p. 558-562, 2006.

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

4. CAPÍTULO 02 – BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA DO TRAMADOL INTRAMUSCULAR EM CAPRINOS

Absolute bioavailability of intramuscular tramadol in goats

Artigo submetido ao periódico
PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Biodisponibilidade absoluta do tramadol intramuscular em caprinos

RESUMO.- Objetivou-se realizar um estudo de biodisponibilidade absoluta do tramadol intramuscular em caprinos, na dose de 4 mg.kg⁻¹, bem como validar metodologia para determinação do opioide e seu principal metabólito O-desmetiltramadol, por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplado a espectrometria de massas. Dez caprinos adultos receberam a dose de 4 mg.kg⁻¹, por via intravenosa e intramuscular com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Em seguida foram colhidos 3 mL de sangue venoso, em tempos atribuídos, para obtenção do plasma e este foi posteriormente analisado por um método HPLC. Não foram observados efeitos adversos após a administração do tramadol intravenoso e intramuscular. O método foi validado e em seguida observou-se que o tramadol e o metabólito foram eluídos com tempo de retenção de 0,59 e 0,56 minutos, respectivamente, e verificou-se que os caprinos além de formar o principal metabólito (M1), também realizam a formação de mais outros dois (M2 e M3). Os três metabólitos foram identificados em ambas vias de administração e em todos os animais avaliados, sendo o M1 em todos os casos o de maior concentração. O M2 e M3 foram identificados a partir do primeiro momento de avaliação (5 minutos após administração do tramadol) permanecendo por no máximo até 4 horas. A biodisponibilidade do tramadol intramuscular foi de 62% (F= 0,62±0,35).

PALAVRAS-CHAVE: M1. Analgesia. Pequenos ruminantes.

The objective of this study was to perform an absolute bioavailability study of intramuscular tramadol in goats at a dose of 4 mg.kg⁻¹, as well as to validate a methodology for the determination of opioid and its main metabolite O-desmethyltramadol by means of ultra- Coupled to mass spectrometry. Ten adult goats received the dose of 4 mg.kg⁻¹ intravenously and intramuscularly with a 15 day interval between the applications. Then, 3 mL of venous blood was collected at times assigned to obtain the plasma and this was later analyzed by an HPLC method. No adverse effects were observed after administration of intravenous and intramuscular tramadol. The method was valid and then it was observed that tramadol and the metabolite were eluted with retention time of 0.59 and 0.56 minutes, respectively, and it was verified that goats besides forming the main metabolite (M1) , Also carry out the formation of two others (M2 and M3). The three metabolites were identified in both administration routes and in all evaluated animals, with M1 in all cases being the highest concentration. M2 and M3 were identified from the first assessment (5 minutes after administration of tramadol) and remained for up to 4 hours. The bioavailability of intramuscular tramadol was 62% (F = 0.62 ± 0.35).

KEYWORDS: M1. Analgesia. Small Ruminants.

INTRODUÇÃO

O tramadol é um analgésico opioide de ação central análogo da codeína, que possui mecanismo de ação por interação fraca com os receptores opioides μ associado com um mecanismo não opioide: inibição da receptação de noradrenalina e serotonina. Este fármaco é rotineiramente utilizado na clínica médica e cirúrgica de pequenos animais e provou ser útil para a prevenção e tratamento da dor nas mais diversas situações clínicas, seja administrado isoladamente ou em associação (HABIBIAN et al. 2011).

A metabolização do tramadol tem sido investigada em diversas espécies animais e verificou-se estreita relação com a atividade analgésica (GIORGI et al. 2007, GIORGI et al. 2009). O opioide sofre ação das enzimas do citocromo P450, formando diversos metabólitos, entretanto destes, o mais importante é o O-desmetiltramadol (M1), considerado o único ativo e o responsável pela atividade analgésica, uma vez que possui elevada afinidade pelo receptor opioide μ , podendo ser 200 vezes maior que o tramadol (HENNIES et al. 1988, RAFFA & STONE 1992, DE LEO et al. 2009). Além do M1, outros 25 metabólitos são relatados no homem, cães e ratos (DEPRIEST et al. 2015, GROND & SABLITZKI 2004, WU et al. 2002).

Para a determinação do tramadol e seus metabólitos em plasma animal foram utilizados vários métodos, destacando-se dentre eles a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com diferentes técnicas de detecção, como a ultravioleta, fluorescência e espectrometria de massas (DE LEO et al. 2009). A junção da CLAE com a espectrometria de massas (LCMS) alia a grande vantagem da cromatografia, caracterizada pela eficiente separação, com a espectrometria de massas que apresenta elevada seletividade, obtenção de informação estrutural e massa molar (JARDIM et al. 2006, VÉKEY 2009).

A farmacocinética e biodisponibilidade do tramadol foi investigada no homem, cães, cavalos, asininos, alpacas, lhamas entre outras espécies (KUKANICH & PAPICH 2004, ELHAKIM et al. 2005, DHANJAL et al. 2009, GIORGI et al. 2009, EDMONDSON et al., 2011, COX et al. 2010). Em caprinos, o único estudo realizado até o momento por Sousa et al. (2008) determinou a farmacocinética do tramadol na dose de 2 mg.kg⁻¹, observou baixa concentração plasmática de tramadol e M1, sugerindo que esta dose não permitiria atingir concentração mínima necessária para analgesia na espécie.

Até o momento poucos analgésicos estão disponíveis para uso em caprinos devido a deficiência de estudos relacionados ao tratamento da dor para esta espécie animal. Além

disto, aqueles que possuem sua atividade comprovada, por exemplo os AINES, apresentam relevantes efeitos adversos. Nesse contexto, o tramadol aparece como alternativa para prevenção e tratamento da dor nesta espécie animal.

Em virtude disto, conhecer a cinética do medicamento e de seu metabólito no organismo, especialmente quando administrado na dose supostamente eficaz e por via de administração comumente utilizada na prática clínica, é de grande importância para fundamentar o uso do tramadol no controle da dor nos caprinos.

Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de biodisponibilidade absoluta do tramadol intramuscular em caprinos, na dose de 4 mg.kg⁻¹, bem como validar metodologia para determinação do opioide e seu principal metabólito O-desmetiltramadol, por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplado a espectrometria de massas.

MATERIAL E MÉTODOS

As condições do estudo foram submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA), sob número de parecer 04/2013 e protocolo 23091.000684/2013-04.

Animais

Foram utilizados 10 caprinos (*Capra hircus*), adultos, machos sem padrão racial definido, oriundos de propriedades rurais do Estado do Rio Grande do Norte. Foram incluídos no estudo somente os animais considerados saudáveis mediante avaliação física e exames complementares de hemograma completo e bioquímica renal e hepática. Os animais foram desverminados e aclimatados aos piquetes nos quais permaneceram durante a pesquisa, sendo fornecida dieta constituída de capim elefante fresco acrescido de um concentrado industrial, duas vezes por dia, além de sal mineral e água *ad libitum*. Previamente ao dia do estudo, foram submetidos à restrição alimentar e hídrica de vinte e quatro e doze horas respectivamente, sendo a água e a ração fornecidos somente 4 horas após a administração do fármaco.

Delineamento experimental

Em todos os caprinos foram administrados tramadol, na dose de 4 mg.kg⁻¹, por via intravenosa e intramuscular com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Após a administração do fármaco, foram colhidos 3 mL de sangue venoso, acondicionados em tubos contendo EDTA e posteriormente centrifugado a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, o qual mantido a -80 °C. As coletas de sangue foram feitas nos momentos 0 (antes da administração do tramadol) e aos que se seguem em 5, 15, 30, 45 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas após a administração.

Padrões e produtos químicos

O cloridrato de tramadol e o padrão primário do O-desmetiltramadol foram adquiridos da LAS do Brasil (São Paulo, Brasil). Os solventes acetonitrila, metanol e ácido fórmico apresentavam pureza para uso em cromatografia líquida de alta eficiência e foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura utilizada foi produzida por um Sistema de água Milli-Q Millipore (Millipore, MA).

Instrumentação e condições cromatográficas

As concentrações plasmáticas de tramadol e O-Desmetiltramadol (M1) foram analisadas utilizando um sistema Nexera UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O sistema Nexera UHPLC consistiu de um controlador de sistema (CBM-20A), duas bombas (LC-30AD), autoinjeter (SIL-30AC), forno para coluna (CTO-30AD) e degaseificador (DGU-20A5R). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando coluna C18 Shimpack XR ODS III (Shimadzu, Kyoto, Japão), 1.6 µm (75 x 2 mm), mantido a temperatura de 40 °C. Para controle dos instrumentos e posterior análise e processamento dos dados, o software LabSolutions LCMS (Shimadzu) foi utilizado. A metodologia utilizada foi baseada na desenvolvida por Wynne et al. (2012), com adaptações para se adequar as condições analíticas. As amostras foram eluídas com fluxo isocrático de ácido fórmico 0.098% e acetonitrila (75:25). O fluxo da fase móvel foi de 0.3 mL/min. As amostras foram injetadas a um volume de 5 µL, e o tempo total de corrida foi de 1.2 minutos. O detector de massas foi operado em modo positivo com uma fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI). Os parâmetros operacionais foram otimizados como segue: fluxo de gás nebulizador, 3 L/min; fluxo de gás de secagem, 15 L/min;

temperatura da linha de dessolvatação (DL), 250 °C; temperatura do bloco de calor (HB), 400 °C. Realizou-se múltiplo monitoramento de reações (MRM) para a quantificação do tramadol (T) e O-desmetiltramadol (M1). Monitorou-se a transição do íon formado a partir do precursor 264 m/z para o íon fragmentado ou filho 58 m/z para T, enquanto que para o M1, o precursor foi 250 m/z e íon fragmentado 58 m/z. Além disto, foram realizados MRM para identificação dos demais metabólitos do T, M2, M3 e M4, com íons precursores de 280, 266, 236, e íons filhos 58, 58, 58, respectivamente. Para todos os analitos, utilizou-se tempo de permanência de 10, energia de colisão (CE) -52 V.

Preparo das amostras

As amostras de plasma caprino foram colocadas para descongelar naturalmente e agitadas em vórtex antes de sua utilização. Realizou-se processo de precipitação de proteínas no qual a 100 µL de plasma foram adicionados 400 µL de acetonitrila, em seguida agitadas em vórtex durante 1,5 min. A mistura foi então centrifugada a 4000 rpm, durante 15 minutos. Do sobrenadante, foram pipetados 400 µL, que após filtrado, foi injetado em UHPLC-MS. O método foi validado, baseado nos critérios descritos na resolução da ANVISA nº899, de 29 de maio de 2003, determinando seletividade, Precisão, exatidão, recuperação e linearidade, com curva de calibração contemplando de 12 a 125 ng/mL de tramadol e M1.

Análises farmacocinéticas

A análise farmacocinética do T e M1 foi realizada de acordo com um modelo não compartimental, utilizando o software WinNonlin (Pharsight Co., CA, versão 6.3). A concentração plasmática máxima (C_{máx}) e o tempo para que ela fosse estabelecida (T_{máx}) foram obtidas diretamente da observação dos dados. Foram calculados: área sob a curva do tempo zero ao infinito (AUC inf), área sob a curva do tempo zero ao tempo t (AUC last) e tempo de meia vida (T_{1/2}). Para o cálculo da biodisponibilidade (F), considerou-se a seguinte fórmula:

$$F = \frac{\text{AUClast IM} \times \text{Dose IV}}{\text{AUClast IV} \times \text{Dose IM}}$$

Realizou-se análise de variância (ANOVA) após transformação dos dados para os seus valores logarítmicos (ln). Usando a variância do erro (S₂), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) foram calculados.

RESULTADOS

Após a administração do tramadol intravenoso e intramuscular, não foram observados efeitos adversos que são comuns após uso de opioides em outras espécies, como salivação, ataxia, tremores musculares, timpanismo, constipação ou qualquer alteração deletéria nas frequências cardíaca e respiratória, temperatura e pressão arterial.

O método utilizado para determinação do tramadol e seus metabólitos foi validado. Demonstrou linearidade, com coeficiente de correção (R^2) de 0,9995 e equação da reta $y=1638,2x-1897,2$ para o tramadol, e $R^2 = 0,9879$ com equação da reta $y=532,71x+558,37$ para o O-desmetiltramadol.

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados em três concentrações: alta (125 ng.mL⁻¹), média (40 ng.mL⁻¹) e baixa (12 ng.mL⁻¹). Os desvios (%) apresentados encontram-se dentro do permitido pela legislação brasileira e pelo ICH. As condições experimentais permitiram obter alto percentual de recuperação.

Por meio desta metodologia, o tramadol e o metabólito foram eluídos com tempo de retenção de 0,59 e 0,56 minutos, respectivamente (Figura 1) e o limite de quantificação foi de 2 ng.mL⁻¹. Verificou-se que os caprinos além de formar o principal metabólito, também realizam a formação de mais outros dois. Apesar de não haver padrão e por consequência, não ter sido realizado a quantificação, o método utilizado foi capaz de identificar concentrações plasmáticas de M2 e M3. Os três metabólitos foram identificados em ambas vias de administração e em todos os animais avaliados. Dos três metabólitos, o M1 em todos os casos foi o de maior concentração, apresentando pico com área superior aos demais metabólitos. O M2 e M3 foram identificados a partir do primeiro momento de avaliação (5 minutos após administração do tramadol) permanecendo por no máximo até 4 horas, sendo que o pico de identificação do M3, apresentava área superior ao do M2 (Figura 2).

Figura 01 – Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol e seu metabólito M1 em plasma caprino, obtido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas.

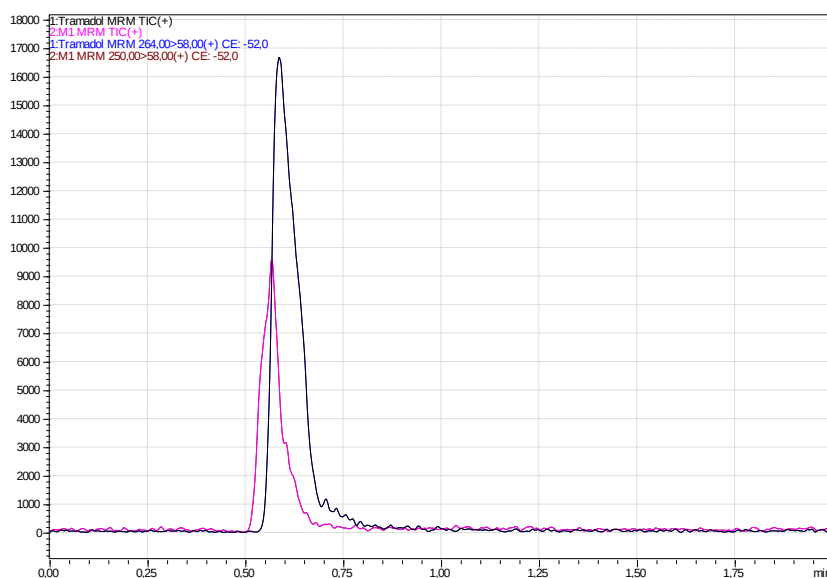
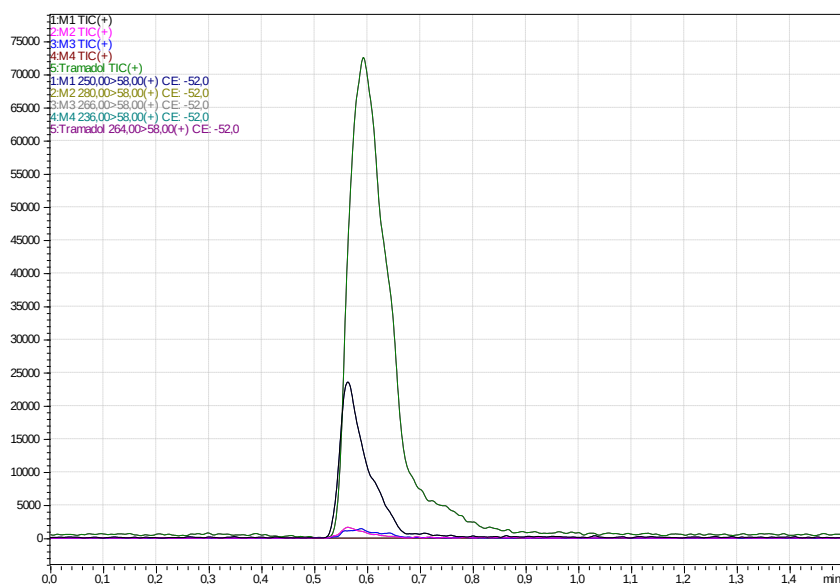


Figura 02 – Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol (verde) e seus metabólitos M1 (preto), M2 (rosa) e M3 (azul) em plasma caprino, obtido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas.



As concentrações plasmáticas do tramadol e M1 ao longo do tempo, após administração do opioide pelas vias intravenosa e intramuscular, são apresentadas na figura 3. Neste estudo, os parâmetros farmacocinéticos AUCobs, AUCinf, C_{máx}, T_{máx} e T_{1/2}

foram usados para comparar as vias de administração e permitir determinar a biodisponibilidade do tramadol intramuscular. Os valores dos parâmetros farmacocinéticos para o opioide e seu metabólito são demonstrados na tabela 01. A biodisponibilidade do tramadol intramuscular foi de 62% ($F = 0,62 \pm 0,35$).

Figura 03 – Distribuição das concentrações plasmáticas do tramadol e O-desmetiltramadol (M1) ao longo do tempo, após administração por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1} .

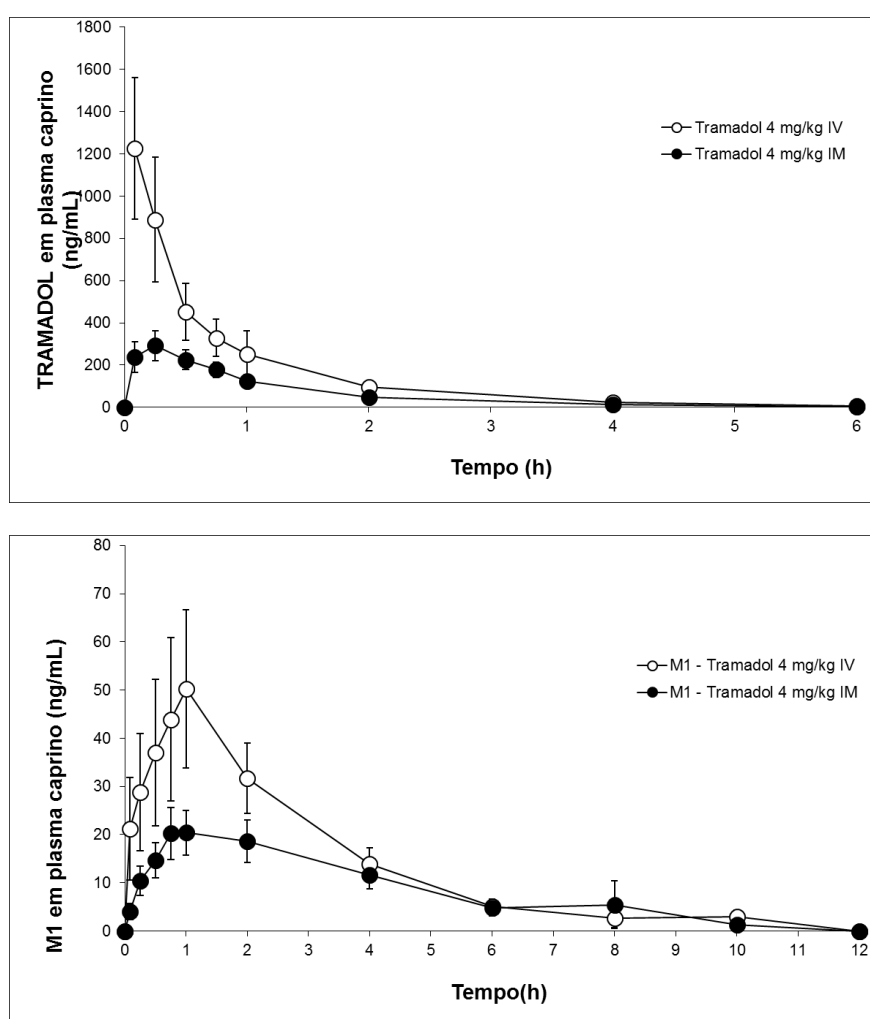


Tabela 01 – Parâmetros farmacocinéticos do tramadol e M1 após administração intravenosa e intramuscular em caprinos, na dose de 4mg.kg^{-1} . Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.

TRAMADOL		AUC 0-inf (ng*h/mL)	AUC last (ng*h/mL)	C _{máx} (ng.ml ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)
IV	Média	932.90	879.64	1342.51	0.03	10.88
	DP	748.76	752.17	1186.02	0.08	5.75
	CV%	80.3	85.5	88.3	316.2	52.9
IM	Média	391.37	372.73	278.35	0.28	6.65
	DP	251.97	247.71	213.64	0.13	3.49
	CV%	64.4	66.5	76.8	44.3	52.4

M1		AUC 0-inf (ng*h/mL)	AUC last (ng*h/mL)	C _{max} (ng.ml ⁻¹)	T _{max} (h)	t _{1/2} (h)
IV	Média	134.47	129.52	52.47	1.08	1.32
	DP	119.90	117.99	55.30	0.50	0.46
	CV%	89.2	91.1	105.4	46.6	35.0
IM	Média	75.39	68.04	21.84	1.13	1.58
	DP	57.72	59.37	16.05	0.49	0.83
	CV%	76.6	87.3	73.5	43.5	52.2

DISCUSSÃO

O presente estudo amplia as informações relativas a farmacocinética do tramadol em caprinos. Além disto, relata a biodisponibilidade do opioide intramuscular e caracteriza a formação dos metabólitos na espécie. Os dados apresentados fornecem informações importantes que guiarão novos estudos sobre farmacocinética e eficácia analgésica do tramadol em caprinos.

Após aplicação do tramadol nesta espécie, não foram observados efeitos adversos, demonstrando a segurança do opioide nessa dose e vias de administração. Esse fato assemelha-se ao descrito anteriormente em caprinos após aplicação de 2mg.kg⁻¹ intravenoso e oral (SOUSA et al. 2008). Espasmos musculares, foram observados em cavalos após administração intravenosa rápida de tramadol (SHILO et al. 2007) e os efeitos adversos mais comuns descritos em humanos são: náusea, tonturas, sonolência, cansaço, sudorese, vômitos e boca seca (SCOTT & PERRY 2000).

A metodologia utilizada nesta pesquisa permitiu quantificação do tramadol e O-desmetiltramadol, além de propiciar a identificação de mais dois metabólitos do opioide em plasma caprino. O método utilizado foi baseado no descrito anteriormente para plasma humano (WYNNE et al. 2012), modificado para se adequar as alterações ligadas a matriz biológica e equipamento. Após alguns ajustes, o método propiciou determinações qualitativas e quantitativas acuradas, caracterizadas pela utilização de baixo fluxo da fase móvel e curto tempo de corrida, o que permitiu realizar as análises com pouca quantidade de solventes, determinando considerável economia. O preparo da amostra por meio de precipitação de proteínas, em única etapa, foi considerado procedimento simples, rápido e econômico.

Os valores de linearidade, precisão, exatidão e recuperação estiveram dentro dos limites aceitáveis pela norma brasileira, sendo o método validado, cumprindo todos os quesitos do regulamento – RE ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA 2003).

O tramadol e seus metabólitos foram identificados e quantificados no homem e em várias espécies animais por meio cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a diferentes detectores. Neste estudo optou-se pela utilização da CLAE associada à espectrometria de massas por aliar uma eficiente técnica de separação com detector de alta sensibilidade e especificidade (JARDIM et al. 2006, VÉKEY 2009). Os materiais e métodos empregados nessa pesquisa servem de base para estudos futuros para determinação do tramadol e seus metabólitos em plasma caprino.

A biotransformação desse opioide é composta por duas fases, realizadas pelas enzimas do citocromo P450. Na fase I, são formados os metabólitos primários, sendo as principais vias metabólicas, a O e N-desmetilação, resultando deste processo, o O-Desmetiltramadol (M1) e N-Desmetiltramadol (M2). Essa etapa é de fundamental importância, uma vez que as pesquisas demonstraram que somente o metabólito M1 (O-desmethiltramadol) é ativo e o responsável pela analgesia do fármaco (DE LEO et al. 2009). Posteriormente, os compostos primários M1 e M2 sofrem sulfatação ou glucuronidação nas reações de fase II, formando os compostos secundários N-,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4) e N-,O-didesmetiltramadol (M5) (LINTZ et al. 1981, SUBRAHMANYAM et al. 2001). Nesta pesquisa, em todos os animais os metabólitos M1, M2 e M3 foram formados, ao passo que em nenhum caprino o M4 foi identificado.

Optou-se pela avaliação da biodisponibilidade intramuscular do tramadol devido a praticidade e amplo uso desta via na rotina clínica. Até o momento não havia na literatura estudos comparando farmacocinética do opioide pelas vias IV e IM em caprinos. Efeitos adversos de reações locais não foram observados, indicando a via intramuscular como uma alternativa segura para administração do opioide na espécie.

Maiores valores de AUC foram observados tanto para tramadol quanto para M1, nos animais que receberam o opioide por via intravenosa. Esse parâmetro é importante para o cálculo da biodisponibilidade já que a quantidade da absorção sistêmica do fármaco é diretamente relacionada com a AUC. Biodisponibilidade diz respeito a velocidade e extensão nas quais a substância ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação (FDA 2003, ANVISA 1998). É determinada por meio da relação entre as áreas sob a curva de concentração plasmática do fármaco versus tempo, tendo-se como referência uma injeção intravenosa, na qual a biodisponibilidade é de 100% (STORPIRTIS e CONSIGLIERI 1995). Os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a biodisponibilidade intramuscular do tramadol foi de 62%, bastante superior ao encontrado para o opioide em caprinos após administração oral ($30 \pm 7\%$) (SOUSA et al. 2008), porém, inferior a biodisponibilidade observada em lhamas ($110 \pm 21\%$) e camelos ($101,62 \pm 9,38$) (COX et al. 2010; ELGHAZALIA et al. 2008).

O tramadol foi rapidamente absorvido após administração IM, atingindo $C_{m\acute{a}x}$ em 0,28 h após a aplicação do opioide e, quanto ao metabólito, $T_{m\acute{a}x}$ foi 1,13 h pela via IM e 1,08 h IV, sendo estes momentos provavelmente o pico máximo de efeito analgésico do tramadol. O $T_{m\acute{a}x}$ do tramadol observado, foi próximo ao descrito para o homem (30-45 minutos) (GROND e SABLITZKI 2004) e também em lhamas (0,2 h) (COX et al. 2010).

Após aplicação intravenosa, elevado $C_{m\acute{a}x}$ do medicamento foi observado, devido a direta aplicação na circulação sanguínea. No caso da via intramuscular, em virtude da administração do fármaco no espaço extravascular, há necessidade de absorção para a circulação sistêmica, sendo que para este caso, com o processo de absorção, houve considerável redução no valor de $C_{m\acute{a}x}$.

Esta diferença foi mais evidente para o $C_{m\acute{a}x}$ do tramadol do que para seu metabólito. Após aplicação do fármaco intravenoso, $C_{m\acute{a}x}$ do opioide foi cerca de oito vezes mais elevada do que após aplicação IM. Apesar desta grande diferença na

concentração da droga inalterada, para o metabólito a elevação no $C_{m\acute{a}x}$ para a via intravenosa foi em média de 2,4 vezes quando comparada com a via intramuscular.

Este fato pode estar relacionado com a saturação do sistema de metabolização do analgésico. O M1 é formado a partir do metabolismo de fase I do tramadol, por meio de uma reação de O-desmetilação, catalisada pela CYP2D6. Esta enzima pertence ao grupo das P450 e apesar de ser de grande importância para a metabolização do opioide, já que aproximadamente 80% do fármaco é metabolizado pela CYP2D6, ela corresponde somente a cerca de 1 a 5% da quantidade das enzimas desta família. A literatura aponta que a capacidade de ligação dessa molécula é baixa, assim como é facilmente saturada (BOSILKOVSKA et al. 2012, MIOTTO et al. 2017).

O tempo de meia-vida para o tramadol foi relacionado com os valores de concentração plasmática. Quando os animais foram tratados com o opioide intravenoso, elevados valores de $C_{m\acute{a}x}$ e de $T_{1/2}$ foram evidenciados. Já após administração intramuscular, quando houve significativa redução nos valores de concentração plasmática do medicamento, também houve queda no tempo de meia-vida. Essa relação entre os dois parâmetros foi descrita anteriormente em humanos (KHOSROJERD et al. 2015) e pode estar relacionada também com a metabolização do opioide e saturação do sistema enzimático necessário para a biotransformação do tramadol.

O longo $t_{1/2}$ observado nesta pesquisa para o tramadol é semelhante ao relatado em humanos, para os quais foram descritos tempo de meia-vida entre 6 e 9 horas (GROND & SABLITZKI 2004, ARDAKANI et al. 2007, KHOSROJERD et al. 2015). Entretanto, os valores obtidos nessa pesquisa são consideravelmente superiores aos obtidos em estudos com outras espécies animais. Em camelos, após aplicação de 2,3 mg/kg de tramadol, a meia-vida de eliminação foi de $3,24 \pm 0,55$ h após administração de fármaco IM, e $1,33 \pm 0,18$ h após administração IV (ELGHAZALIA et al., 2008). Já em lhamas, $t_{1/2}$ para o tramadol intravenoso foi de $2,12 \pm 0,37$ h e quando administrado IM, obtiveram valores $2,54 \pm 0,31$ h para o parâmetro (COX et al. 2010). Em caprinos, após aplicação intravenosa de 2 mg/kg de tramadol, o tempo de meia vida curto foi observado para o opioide (0,94 h) em caprinos (SOUSA et al. 2008).

Os animais tratados com o opioide intravenoso, tiveram $t_{1/2}$ para o M1 de $1,32 \pm 0,46$ h, e os que receberam tramadol intramuscular, $1,58 \pm 0,83$ h. Esses valores são inferiores aos relatados anteriormente em caprinos após aplicação intravenosa do analgésico ($2,89 \pm$

0,43h) (SOUSA et al. 2008), lhamas ($10,4 \pm 2,91h$ e $7,73 \pm 0,50h$, quando utilizado o tramadol IV e IM, respectivamente) (COX et al. 2010) e também em cavalos após administração intravenosa ($3,83 \pm 0,86h$) (KNYCH et al. 2012).

Em humanos, a concentração mínima eficaz (MEC) necessárias para que analgesia clínica seja evidenciada é de no mínimo 100 ng/ml para o tramadol (MALONNE 2004) e $39,6 \pm 29,5$ para o M1 (LEHMANN et al. 1990, GROND et al. 1999). Após administração IV ou IM de tramadol nos caprinos neste estudo, essas elevadas concentrações foram mantidas por curto período de tempo. Entretanto, salienta-se que não há dados na literatura que determinem a concentração alvo, mínima eficaz em caprinos para o tramadol e a extrapolação realizada a partir dos dados de estudos em humanos deve ser feita com ressalva, já que pode constituir interpretações errôneas (GIORGI 2012).

Além disto, alguns estudos demonstraram que os efeitos clínicos de fármacos de ação central nem sempre estão relacionados com sua concentração no plasma. O que sugere que as concentrações plasmáticas destes medicamentos podem não refletir os seus efeitos farmacológicos (MIKSYS et al. 2000, ALTAR et al. 2013).

Por este motivo, associar os dados da farmacocinética e farmacodinâmica, por meio da avaliação clínica e comprovação da eficácia analgésica do tramadol em caprinos, é de fundamental importância.

CONCLUSÕES

O tramadol intramuscular apresentou biodisponibilidade de 62% em caprinos.

O metabólito M4 do tramadol não foi evidenciado nos animais estudados e dentre os metabólitos formados, o M1 foi o de maior importância.

Outros estudos são necessários para evidenciar correlação entre analgesia clínica e concentração mínima do M1 necessária para promover analgesia na espécie.

Agradecimentos - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto nº 474936/2013-9.

REFERÊNCIAS

ALTAR C.A., HORNBERGER J., SHEWADE A., CRUZ V., GARRISON J., MRAZEK D. Clinical validity of cytochrome P450 metabolism and serotonin gene variants in psychiatric pharmacotherapy. **International Review of Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 509-33, 2013.

ANVISA 1998. **Portaria N 3916/MS/GM**, de 30 de outubro de 1998. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/glossario/glossario_b.htm> Acesso em 30 de março de 2017.

ANVISA 2003. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em 13 de novembro de 2013.

ARDAKANI Y.H, ROUINI M.R. Pharmacokinetics of tramadol and its three main metabolites in healthy male and female volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 28, n. 9, p. 527-534, 2007.

BOSILKOVSKA M., WALDER B., BESSON M., DAALI Y., DESMEULES J. Analgesics in patients with hepatic impairment: pharmacology and clinical implications. **Drugs**. 72(12):1645–1669, 2012.

COX S., MARTIN-JIMENEZ T., VAN AMSTEL, S., DOHERTY, T. Pharmacokinetics of intravenous and intramuscular tramadol in Llamas. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 259-264, 2010.

DE LEO, M. et al. Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, n.2, p. 228-236, 2009.

DEPRIEST A.Z., PUET B.L., HOLT A.C., ROBERTS A., CONE E.J. Metabolism and disposition of prescription opioids: a review. **Forensic Science Review**, v. 27, n. 2, p. 115–145, 2015.

Dhanjal J.K., Wilson D.V., Robinson E., Tobin T.T., Dirikolu L. Intravenous tramadol: effects, nociceptive properties, and pharmacokinetics in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 36, p. 581–590, 2009.

EDMONDSON M.A., DURAN S.H., BOOTHE D.M., STEWART A.J. RAVIS, W.R. Pharmacokinetics of tramadol and its major metabolites in alpacas following intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 389–396, 2011.

ELGHAZALI M., BAREZAIK I.M., ABDEL HADI A.A., ELTAYEB F.M., AL MASRI J & WASFI IA. The pharmacokinetics, metabolism and urinary detection time of tramadol in camels. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 272–277, 2008.

ELHAKIM M., ABD EL-MEGID W., METRY A., EL-HENNAWY A. & EL-QUESENY K. 2005. Analgesic and antacid properties of i.m. tramadol given before Caesarian section under general anesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, p. 811–815, 2005

FDA-FOOD and drug administration. **Compliance program guidance manual – in vivo bioequivalence.** Disponível em:
<https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/ComplianceProgramManual/ucm255614.htm>> Acesso em Acesso em 30 de março de 2017.

GIORGI M., CARLO S.D., SGORBINI M. & SACCOMANNI G. Pharmacokinetics of Tramadol and Its Metabolites M1, M2, and M5 in Donkeys after Intravenous and Oral Immediate Release Single-Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

Giorgi M., Soldani G., Manera C., Ferrarini P.L., Sgorbini M., & Saccomanni G. Pharmacokinetics of Tramadol and its Metabolites M1, M2 and M5 in Horses Following

Intravenous, Immediate Release (Fasted/Fed) and Sustained Release Single Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 481-488, 2007.

GIORGI, M. Veterinary pharmacology: Is it still pharmacology's Cinderella? *Clin Exp Pharmacol*. 2:2, 2012.

GROND S. & SABLITZKI A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clinical pharmacokinetics**, v.43, n.13, p. 879-923, 2004.

HABIBIAN, S.; BIGHAM, A. S.; AALI, E. Comparison of lidocaine, tramadol and lidocaine-tramadol for epidural analgesia in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 434-438, 2011.

HENNIES, H. H.; FRIDERICH, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, p. 877-880, 1988.

JARDIM I.C.S.F., COLLINS, C.H. & GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins C. H., Braga G. L., Bonito P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas SP: Editora da UNICAMP, 453 p.

KHOSROJERDI H., ALIPOUR TALESH G., DANAEI G.H., SHOKOOH SAREMI S., ADAB A. & AFSHARI R. Tramadol half life is dose dependent in overdose. **Daru**, v. 23, n. 1, p. 22, 2015.

KNYCH H.K., CORADO C.R., MCKEMIE D.S. & STEFFEY E.P. Pharmacokinetics and selected pharmacodynamic effects of tramadol following intravenous administration to the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 4, p. 490-496, 2013.

KUKANICH, B.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyiltramadol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 239-46, 2004.

LINTZ, W.; URAGG, H. Quantitative determination of tramadol in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography**, v. 341, n. 1, p. 65-79, 1998.

MALONNE, H. et al. Efficacy and tolerability of sustained-release tramadol in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the hip or knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 11, p. 1774-1782, 2004.

MIKSYS S., RAO Y., SELLERS E.M., KWAN M., MENDIS D. & TYNDALE RF. Regional and cellular distribution of CYP2D subfamily members in rat brain. **Xenobiotica**, v. 30, n. 6, p. 547-564, 2000.

MIOTTO K., CHO A.K., KHALIL M.A., BLANCO K. & SASAKI J.D.. Rawson R.. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. **Anesthetic Clinical Pharmacology**, v. 124, n. 1, p. 44-51, 2017.

RAFFA, R. B.; STONE, D. J. Unexceptional seizure potential of tramadol or its enantiomers or metabolites in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 557-562, 2008.

SCOTT, P. R. The management and welfare of some common ovine obstetrical problems in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 33-40, 2005.

SHILO Y., BRITZI M., EYTAN B., LIFSCHITZ T., SOBACK S. & STEINMAN A. Pharmacokinetics of tramadol in horses after intravenous, intramuscular and oral administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 60-65, 2008.

SOUSA, A. B. et al. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyltramadol in goats after intravenous and oral administration. **Journal veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 45-51, 2008.

STORPIRTIS S., & CONSIGLIERI V.O. Biodisponibilidade e Bioequivalência de medicamentos: Aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

SUBRAHMANYAM V., RENWICK A.B., WALTERS D.G., YOUNG P.J., PRICE R.J., TONELLI A.P. & LAKE B.G. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metabolism & Disposition*, v. 29, n. 8, p. 1146–1155, 2001.

VÉKEY K.J. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. ***Journal of Chromatography A***, v. 921, n. 2, p. 227–236, 2001.

WU W.N., MCKOWN L.A. & LIAO S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. ***Xenobiotica***, v. 31, p. 423–441, 2002.

WYNNE P., GRIEVES N., EGAN S., ZAHRA P, VINE J. & LAWRENCE M. The application of Ultrafast LCMS to optimizing detection in the analysis of tramadol and its metabolites. TIAFT 2012 - the 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists took place 3–8 June 2012 in Hamamtsu, Japan.

5. CAPÍTULO 03 – FARMACOCINÉTICA DO TRAMADOL E O-DESMETILTRAMADOL EM CAPRINOS, APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA E INTRAMUSCULAR

Pharmacokinetics of tramadol and O-desmetiltramadol in goats, after intravenous and intramuscular administration

Artigo submetido ao periódico
ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Farmacocinética do tramadol e O-desmetiltramadol em caprinos, após administração intravenosa e intramuscular

RESUMO.- O tramadol é um opioide atípico e apesar de sua extensiva utilização para tratamento da dor no homem e pequenos animais, o uso do tramadol em caprinos é restrita devido a falta de pesquisas que determinem a cinética do medicamento no organismo, comprovem a eficácia analgésica após uso pelas vias parenterais. Objetivou-se determinar a farmacocinética do tramadol e O-desmetiltramadol em caprinos, após aplicação intravenosa e intramuscular, na dose de 4 mg.kg⁻¹. Dez caprinos adultos receberam a dose de 4 mg.kg⁻¹, por via intravenosa e intramuscular com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Em seguida foram colhidos 3 mL de sangue venoso, em tempos atribuídos, para obtenção do plasma e este foi posteriormente analisado por um método HPLC. O método foi validado e em seguida observou-se que o tramadol e o metabólito foram eluídos com tempo de retenção de 0,59 e 0,56 minutos, respectivamente, e verificou-se que os caprinos além de formar o principal metabólito (M1), também realizam a formação de mais outros dois (M2 e M3). Os dados demonstraram a segurança do uso do tramadol e descreveram os parâmetros farmacocinéticos do tramadol e M1 após administração intravenosa e intramuscular em caprinos. A metodologia empregada pode ser usada em futuros estudos contendo o fármaco e matriz biológica. Outros estudos são necessários para aliar os dados farmacocinéticos com avaliação clínica para definir a eficácia analgésica do opioide nesta dose e vias de administração.

PALAVRAS-CHAVE: Dor. Pequenos ruminantes. Dose única.

ABSTRACT.- Tramadol is an atypical opioid and despite its extensive use for the treatment of pain in man and small animals, the use of tramadol in goats is restricted due to lack of research that determines the kinetics of the drug in the body, proves the analgesic efficacy after use Parenteral routes. The aim of this study was to determine the pharmacokinetics of tramadol and O-demethyltramadol in goats, after intravenous and intramuscular administration, at the dose of 4 mg.kg⁻¹. Ten adult goats received the dose of 4 mg.kg⁻¹ intravenously and intramuscularly with a 15 day interval between the applications. Then, 3 mL of venous blood was collected at times assigned to obtain the plasma and this was later analyzed by an HPLC method. The method was valid and then it was observed that tramadol and the metabolite were eluted with retention time of 0.59 and 0.56 minutes, respectively, and it was verified that goats besides forming the main metabolite (M1), Also carry out the formation of two others (M2 and M3). The data demonstrated the safety of tramadol use and described the pharmacokinetic parameters of tramadol and M1 after intravenous and intramuscular administration in goats. The methodology employed may be used in future studies containing the drug and biological matrix. Further studies are needed to combine pharmacokinetic data with clinical evaluation to define the analgesic efficacy of opioid at this dose and route of administration.

INDEX TERMS: Pain. Small Ruminants. Single dose.

INTRODUÇÃO

A preocupação com o controle da dor e manutenção do bem-estar dos animais de produção tem crescido ao passar dos anos. Devido a sua capacidade de pouco demonstrarem no comportamento os sinais de dor e fragilidade, a terapia antiálgica durante muito tempo foi negligenciada. Entretanto, a fisiopatologia da dor e todos os eventos envolvidos nesta, são semelhantes entre as espécies. A pronta identificação da dor nos animais e a correta instituição de terapia é fundamental para manter a produtividade e promover o bem-estar dos animais (PLUMMER; SCHLEINING, 2013).

O tramadol é um agonista opioide frequentemente utilizado na rotina de pequenos animais para alívio da dor em diversas condições clínicas e cirúrgicas, propiciando analgesia de boa qualidade e longa duração. Tais efeitos decorrem de uma interação com receptores opioide além da inibição da receptação de monoaminas (HABIBIAN et al. 2011; MIOTTO et al. 2017).

Após sua administração oral, o fármaco é bem absorvido e extensivamente metabolizado em seres humanos. O estudo sobre a metabolização do tramadol é relevante, uma vez que há correlação com seus efeitos analgésicos (GIORGI et al. 2007, GIORGI et al. 2009). O opioide é um pro-fármaco, que para exibir efeito analgésico significativo, necessita ser metabolizado. O principal metabólito e considerado responsável pelo efeito analgésico, O-desmetiltramadol é formado na a partir da ação das enzimas do citocromo P450, nas reações de fase I, juntamente com o N-Desmetiltramadol (M2). Nas reações de fase II, outros compostos são formados, como N,N-didesmetiltramadol (M3), N,N,O-tridesmetiltramadol (M4) e N,O-didesmetiltramadol (M5) (LINTZ et al. 1981, SUBRAHMANYAM et al. 2001). O opioide e seus metabólitos são eliminados primariamente pelos rins (cerca de 90%) e o remanescente, excretado pelas fezes (GROND & SABLLOTZI 2004).

Em caprinos, poucos trabalhos relatam o uso do tramadol. O opioide foi utilizado por via epidural na espécie, propiciando analgesia e ausência de efeitos adversos, aparecendo para a espécie como uma alternativa para o tratamento da dor tanto para os casos cirúrgicos quanto para as mais variadas situações clínicas que culminam com o processo doloroso (AJADI et al., 2012; DEHKORDI et al., 2012). As características farmacocinéticas do tramadol e M1, após aplicação do opioide na dose de 2 mg.kg⁻¹, intravenoso e oral foram descritas anteriormente (SOUSA et al., 2008). Entretanto, não há dados sobre a cinética do

medicamento em dose superior, clinicamente eficaz, bem como não há estudos determinando os parâmetros farmacocinéticos do medicamento após aplicação intramuscular.

Nesse contexto, objetiva-se determinar a farmacocinética do tramadol e O-desmetiltramadol em caprinos, após administração do opioide na dose de 4 mg.kg⁻¹ por via intravenosa e intramuscular.

MATERIAIS E METODOS

As condições do estudo foram submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA), sob número de parecer 04/2013 e protocolo 23091.000684/2013-04.

Foram utilizados 10 caprinos (*Capra hircus*), adultos, machos sem padrão racial definido, oriundos de propriedades rurais do Estado do Rio Grande do Norte. Foram incluídos no estudo somente os animais considerados saudáveis mediante avaliação física e exames complementares de hemograma completo e bioquímica renal e hepática.

Os animais foram desverminados e aclimatados aos piquetes nos quais permaneceram durante a pesquisa, sendo fornecida dieta constituída de capim elefante fresco acrescido de um concentrado industrial, duas vezes por dia, além de sal mineral e água *ad libitum*. Previamente ao dia do estudo, foram submetidos à restrição alimentar e hídrica de vinte e quatro e doze horas respectivamente, sendo a água e a ração fornecidos somente 4 horas após a administração do fármaco.

Em todos os caprinos foram administrados tramadol, na dose de 4 mg.kg⁻¹, por via intravenosa e intramuscular com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Após a administração do fármaco, foram colhidos 3 mL de sangue venoso, acondicionados em tubos contendo EDTA e posteriormente centrifugado a 2000 G, durante 10 minutos para obtenção do plasma, o qual mantido a -80 °C.

As coletas de sangue foram feitas nos momentos 0 (antes da administração do tramadol) e aos que se seguem em 5, 15, 30, 45 minutos e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas.

As concentrações plasmáticas de tramadol e O-Desmetiltramadol (M1) foram analisadas utilizando um sistema Nexera UHPLC acoplado a um espectrômetro de massa

triplo quadrupolo LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O sistema Nexera UHPLC consistiu de um controlador de sistema (CBM-20A), duas bombas (LC-30AD), autoinjeter (SIL-30AC), forno para coluna (CTO-30AD) e degaseificador (DGU-20A5R). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando coluna C18 Shimpack XR ODS III (Shimadzu, Kyoto, Japão), 1.6 μ m (75 x 2 mm), mantido a temperatura de 40 °C. Para controle dos instrumentos e posterior análise e processamento dos dados, o software LabSolutions LCMS (Shimadzu) foi utilizado.

A metodologia utilizada foi baseada na desenvolvida por Wynne et al. (2012), com adaptações para se adequar as condições analíticas.

As amostras foram eluídas com fluxo isocrático de ácido fórmico 0.098% e acetonitrila (75:25). O fluxo da fase móvel foi de 0.3 mL/min. As amostras foram injetadas a um volume de 5 μ L, e o tempo total de corrida foi de 1.2 minutos.

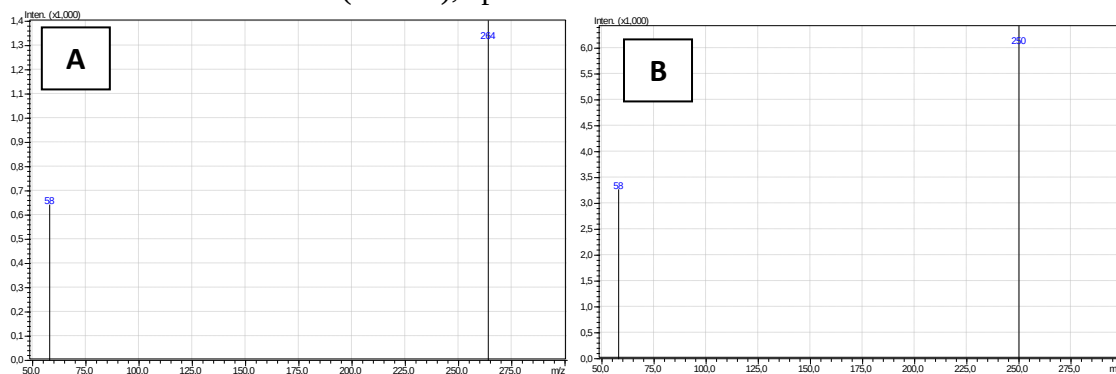
O detector de massas foi operado em modo positivo com uma fonte de ionização do tipo eletrospray (ESI). Os parâmetros operacionais foram otimizados como segue: fluxo de gás nebulizador, 3 L/min; fluxo de gás de secagem, 15 L/min; temperatura da linha de dessolvatação (DL), 250 °C; temperatura do bloco de calor (HB), 400 °C.

Realizou-se múltiplo monitoramento de reações (MRM) para a quantificação do tramadol (T) e O-desmetiltramadol (M1). Monitorou-se a transição do íon formado a partir do precursor 264 m/z para o íon fragmentado ou filho 58 m/z para T, enquanto que para o M1, o precursor foi 250 m/z e íon fragmentado 58 m/z (Figura 01). Além disto, foram realizados MRM para identificação dos demais metabólitos do T, M2, M3 e M4, com íons precursores de 280, 266, 236, e íons filhos 58, 58, 58, respectivamente. Para todos os analitos, utilizou-se tempo de permanência de 10, energia de colisão (CE) -52 V.

As amostras de plasma caprino foram colocadas para descongelar naturalmente e agitadas em vórtex antes de sua utilização. Realizou-se processo de precipitação de proteínas no qual a 100 μ L de plasma foram adicionados 400 μ L de acetonitrila, em seguida agitadas em vórtex durante 1,5 min. A mistura foi então centrifugada a 4000 rpm, durante 15 minutos. Do sobrenadante, foram pipetados 400 μ L, que após filtrado, foi injetado em UHPLC-MS.

O método foi validado, baseado nos critérios descritos na resolução da ANVISA nº899, de 29 de maio de 2003, determinando seletividade, Precisão, exatidão, recuperação e linearidade, com curva de calibração contemplando de 12 a 125 ng/mL de tramadol e M1.

Figura 01 - Espectro de massas íon precursor e íon filho do tramadol (264/58) apresentado em A e O-demetiltramadol (250/58), apresentado em B.



A análise farmacocinética do T e M1 foi realizada de acordo com um modelo não compartimental, utilizando o software WinNonlin (Pharsight Co., CA, versão 6.3).

A concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo para que ela fosse estabelecida ($T_{\text{máx}}$) foram obtidas diretamente da observação dos dados. O volume de distribuição foi calculado, sendo o resultado da divisão da quantidade de tramadol injetado pela concentração plasmática do medicamento. O $t_{1/2}$ foi o valor obtido substituindo a fórmula $0.693/K_e$. O Clearance foi calculado seguindo a fórmula $Cl = k.V_d / t_{1/2}$.

Utilizou-se análise de variância (ANOVA) após transformação dos dados para seus valores logarítmicos (ln). Usando a variância do erro (S^2), obtidos a partir da análise de variância, os intervalos de confiança de 90% (CI) foram calculados.

RESULTADOS

Não foram observados efeitos adversos após aplicação do tramadol pelas vias intravenosa e intramuscular.

O método utilizado para determinação do tramadol e seus metabólitos foi validado, demonstrando linearidade, especificidade, precisão e exatidão tanto para determinação do tramadol quanto do O-desmetiltramadol. O opioide e o seu metabólito foram eluídos com tempo de retenção de 0,59 e 0,56 minutos, respectivamente (Figura 02) e o limite de quantificação foi de 2 ng.mL^{-1} .

A metodologia empregada permitiu identificação do analgésico e seus metabólitos. Adicionando-se os valores de relação massa/carga para M2, M3 e M4, os dados desta

pesquisa demonstraram que o tramadol após metabolização, forma além do M1 que é o seu metabólito principal, concentrações menores de M2 e M3 (Figura 02). Já o metabólito M4, não foi identificado em nenhum dos caprinos analisados nesta pesquisa. Em virtude da ausência de padrão e consequente curva de calibração, os analitos M2, M3 e M4, não puderam ser quantificados.

Os modelos bicompartimental e monocompartimental foram utilizados para descrever a farmacocinética do tramadol e O-desmetiltramadol, respectivamente (Figura 03). A distribuição das concentrações plasmáticas do opioide e o metabólito estão apresentadas nas figuras 4 e 5.

Os parâmetros farmacocinéticos (média $\pm$ erro padrão) do tramadol e M1, após aplicação do opioide por via intravenosa e intramuscular em caprinos estão apresentados nas tabelas 01 e 02.

Figura 02 – Cromatograma onde são evidenciados os picos do tramadol e seu metabólito M1 em plasma caprino, com respectivos tempos de retenção (A) e cromatograma contendo picos do tramadol (verde) e seus metabólitos M1 (preto), M2 (rosa) e M3 (azul) obtido por meio de LCMS.

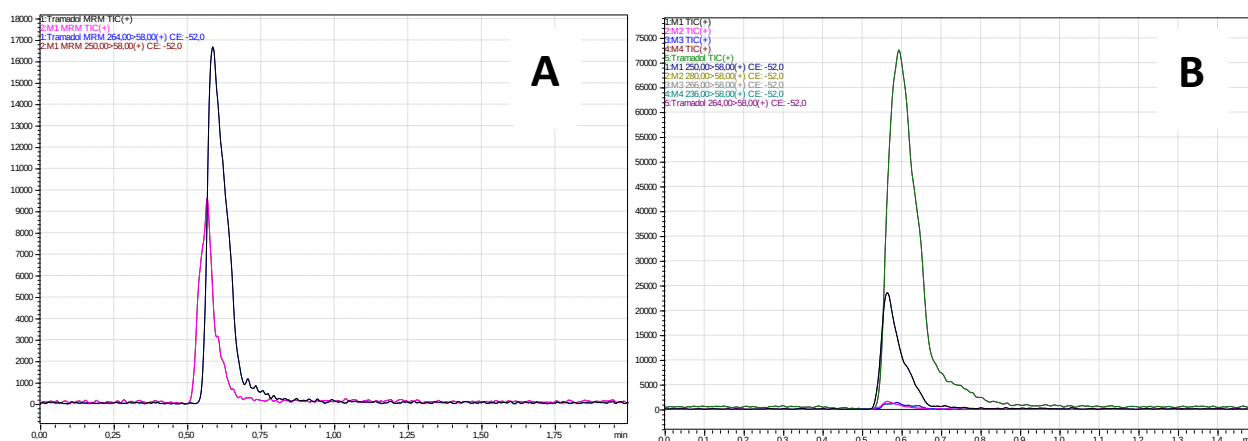


Figura 03 – Representação esquemática do modelo aberto de dois compartimentos (A), utilizado para tramadol e do modelo de um compartimento (B), utilizado para O-Desmetitramadol.

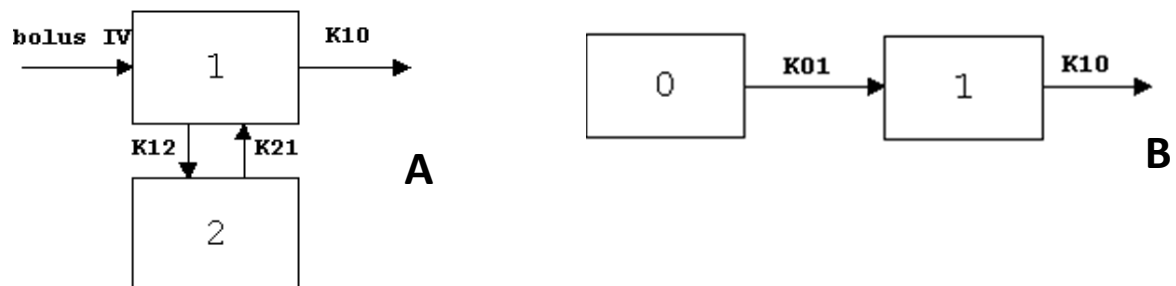


Figura 04 – Distribuição das concentrações plasmáticas do tramadol ao longo do tempo, após sua administração por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1} .

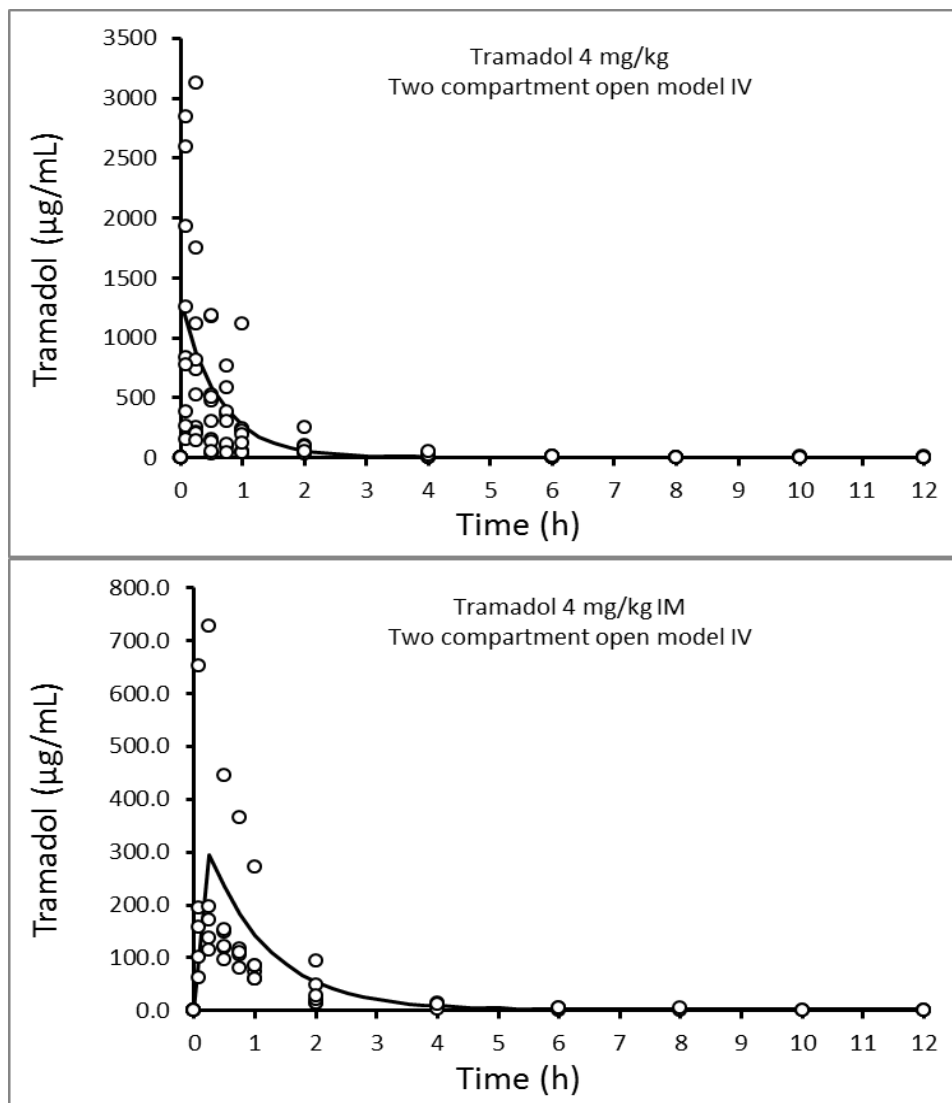


Figura 05 – Distribuição das concentrações plasmáticas do O-desmetiltramadol (M1) ao longo do tempo, após administração do tramadol por via intravenosa e intramuscular, na dose de 4mg.kg^{-1} .

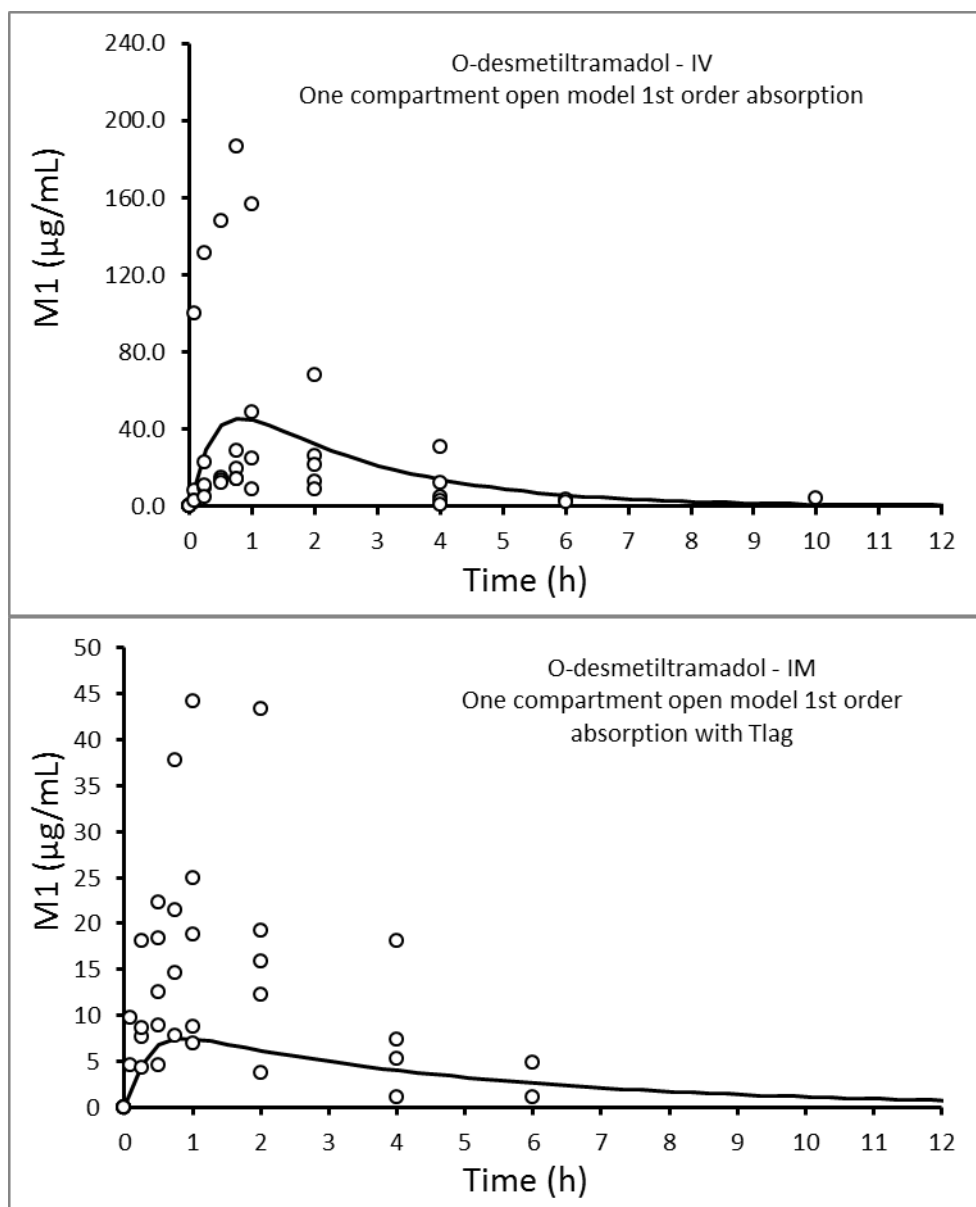


Tabela 01 – Parâmetros farmacocinéticos derivados da análise de dois compartimentos do tramadol, após sua aplicação intramuscular e intravenosa em caprinos. Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.

PARAM	Tramadol IV			Tramadol IM		
	ESTIMADO	EE	CV%	ESTIMADO	EE	CV%
K01 (h⁻¹)				15,304	6,760	44,2
K10 (h⁻¹)	0,998	129,107	12933,6	0,497	56,710	11399,0
K12 (h⁻¹)	0,588	128,941	21931,8	0,505	56,581	11201,9
K21 (h⁻¹)	0,012	2,894	24435,5	0,013	1,593	12521,7
AUC (ng.h/mL)	1296,86	167531,208	12918,2	705,68	80331,372	11383,6
Alpha (h⁻¹)	1,591	0,528	33,2	1,009	0,415	41,1
Beta (h⁻¹)	0,007	2,774	37317,8	0,006	1,498	23877,0
A (ng/ml)	1290,957	191,317	14,8	373,436	75,597	20,2
B (ng/ml)	3,607	122,603	3398,8	2,259	41,094	1819,1
CL/F (L/h/kg)				0,006	0,646	11395,0
Tmax (h)				0,191	0,048	25,4
Cmax (ng/ml)	1294,564	177,165	13,7	290,032	26,882	9,3
Cl (L/h/kg)	0,003	0,399	12931,1			
MRT (h)	50,722	29572,405	58302,7			
Vss (L/kg)	0,156	71,016	45393,3			

NA, não aplicável; K01, constante de absorção; K10, constante de eliminação; K12, Taxa de movimento do compartimento 1 para 2; K21, velocidade de movimento do compartimento 2 para 1; AUC, área sob a curva; α , inclinação de distribuição; β , inclinação de eliminação; A, intercepto para a fase de distribuição; B, intercepto para a fase de eliminação; CL/F, clearance; Cmax, concentração plasmática máxima; Tmax, tempo de concentração de pico; MRT, tempo médio de residência; Vss, volume de distribuição no estado de equilíbrio.

Tabela 02 – Parâmetros farmacocinéticos derivados da análise monocompartimental do O-desmetiltramadol. Dados expressos em média, desvio padrão e coeficiente de variação.

PARAM	M1 - IV			M1 - IM		
	ESTIMADO	EE	CV%	ESTIMADO	EE	CV%
K01 (h⁻¹)	2,662	1,895	71,2	3,892	3,922	100,8
K10 (h⁻¹)	0,429	0,275	64,1	0,215	0,128	59,6
AUC (ng.h/mL)	151,40	53,442	35,3	41,08	16,635	40,5
CL/F (L/h/kg)	0,026	0,009	35,3	0,097	0,039	40,5
Tmax (h)	0,818	0,261	31,9	0,847	0,476	56,2
Cmax (ng/mL)	45,719	6,191	13,5	7,462	1,463	19,6

NA, não aplicável; K01, constante de absorção; K10 constante de eliminação; AUC, área sob a curva; CL/F, clearance; Cmax, concentração plasmática máxima; Tmax, tempo de concentração de pico;

DISCUSSÃO

O tramadol é um analgésico de uso frequente para tratamento da dor em humanos e pequenos animais, aliando alívio da dor e poucos de efeitos adversos. Apesar de aparecer como alternativa viável para prevenção e tratamento de condições dolorosas em caprinos, seu uso é limitado em virtude da ausência de dados na literatura que comprovem seu efeito analgésico bem como que determinem a cinética do medicamento e dos seus metabólitos na espécie, sobretudo após administração intramuscular.

Os dados desta pesquisa fornecem relevantes informações a respeito dos parâmetros farmacocinéticos do tramadol seu principal metabólito, O-desmetiltramadol, em caprinos. Esses achados servirão de base para pesquisas futuras envolvendo o fármaco e espécie animal.

Nas condições deste estudo, o tramadol mostrou-se seguro para uso em caprinos. Os animais tratados com o opioide tanto por via intravenosa quanto pela via intramuscular, não

apresentaram excitação, salivação, tremores, timpanismo ou qualquer outra alteração deletéria, o que assemelha-se ao relatado em estudos anteriores caprinos (Sousa et al., 2008), cães (Vettorato et al., 2010; Paolozzi et al., 2011), asininos (Giorgi et al., 2009) e cavalos (Dhanjal et al., 2009).

Além disto, após aplicação intramuscular não houve formação de reações locais, edema ou prurido, confirmando a via IM como alternativa segura para aplicação do opioide na espécie.

As concentrações plasmáticas do tramadol foram descritas com maior acuidade por meio de um modelo farmacocinético bicompartimental. Neste caso, o organismo animal é descrito como dois compartimentos: o compartimento central, representado pelo sangue, fluido extracelular e tecidos altamente perfundidos, que absorvem a droga rapidamente e a distribuição pode ser considerada instantânea; e o compartimento periférico, que contém tecidos como pele e o tecido adiposo, nos quais a droga se equilibra mais lentamente (Loftsson, 2015).

O tramadol foi rapidamente absorvido por via intramuscular, apresentando elevada constante de absorção (K_{01}). O $T_{m\acute{a}x}$ ocorreu em 0,19 h e foi consistente entre os animais. A rápida absorção e $T_{m\acute{a}x}$ com valores semelhantes foram anteriormente relatados após aplicação intramuscular do opioide em llamas (Cox et al., 2010), cavalos (Shilo et al., 2007). Posteriormente moveu-se entre os compartimentos com velocidade semelhante nas duas vias de administração. Observou-se que ocorreu rápida distribuição através do compartimento central, observado pelo parâmetro k_{12} , e posteriormente foi redistribuído mais lentamente ao longo do compartimento periférico, evidenciado pelos baixos valores de k_{21} . Essa dinâmica é típica de um fármaco que tem sua cinética descrita pelo modelo de dois compartimentos (Loftsson, 2015).

A distribuição do tramadol depende das suas propriedades físico-químicas. Altos valores foram observados para os parâmetros de distribuição (α e A) quando os animais receberam o tramadol endovenoso, caracterizando uma rápida queda na concentração do medicamento, que passa do sangue aos tecidos.

Com relação a constante de eliminação, quando os animais foram tratados com o tramadol intravenoso, elevação no valor foi observado, demonstrando que por esta via há intensificação da eliminação. Possivelmente em virtude disto, de início das avaliações as concentrações plasmáticas para o opioide são bastante elevadas quando os animais

receberam o tramadol intravenoso comparado ao intramuscular, entretanto, passados 2 horas da administração do fármaco, as concentrações equiparam-se.

Elevados valores de AUC e $C_{\text{máx}}$ foram verificados após aplicação do tramadol intravenoso quando comparado ao intramuscular. Esses parâmetros são comumente utilizados para quantificar a extensão da absorção do medicamento (FDA, 2003; Anvisa, 1998). Os dados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a biodisponibilidade intramuscular do tramadol foi de 62%, bastante superior ao encontrado para o opioide em caprinos após administração oral ($30 \pm 7\%$) (Sousa et al., 2008), porém, inferior a biodisponibilidade observada em lhamas ($110 \pm 21\%$) e camelos ($101,62 \pm 9,38$) (Cox et al., 2010; Elghazali et al., 2008).

O efeito analgésico do tramadol também é atribuído ao metabólito M1 (Poulsen et al., 1996, Garrido et al., 2000, 2003; Wu et al., 2001; Parker, 2004). Para o M1, a farmacocinética foi descrita por um modelo de um compartimento. Neste modelo, o corpo é descrito como um compartimento único e uniforme no qual o fármaco é administrado e a partir dele, é eliminado (Loftsson, 2015). A droga injetada atinge a concentração máxima e a partir das suas características físico-químicas e estruturais, começa a reduzir, seguindo uma distribuição uniexponencial (Fernandes e Ismael, 2006).

O perfil plasmático do M1 tem sido descrito em várias espécies animais como cães (Kukanich e Papich, 2004), gatos (Pypendop & Ilkiw, 2008), caprinos (Sousa et al., 2008), ovinos (Bortolami et al., 2015), lhamas (Cox et al., 2010).

A literatura aponta que os metabólitos de M1 a M5 são os principais compostos detectado na urina após a administração do opioide, e são os de maior importância (Grond & Sablotzki, 2004; Wu et al., 2002). As condições e metodologias utilizadas nesta pesquisa permitiram determinar além do tramadol e o M1, outros metabólitos: M2, M3 e M4. De todos os metabólitos, o M1 foi o de maior concentração e o M4 não foi detectado em nenhum dos caprinos.

O tramadol nos humanos é biotransformado nos seus metabolitos por ação das enzimas do citocromo P450, que é depende do genótipo CYP2D (Abdel-Rahman et al., 2002; Pedersen et al., 2006). Em caprinos a importância das vias metabólicas não foram determinadas, bem como não é conhecido a influência genética nesta via metabólica na espécie. Entretanto, com base nas pesquisas realizadas em humanos, há variabilidade significativa na eficiência e quantidade de enzimas CYP2D6 entre os indivíduos, e essa

variação fenotípica pode influenciar consideravelmente na quebra da molécula do opioide e formação dos metabólitos, o que pode consideravelmente influenciar no efeito clínico do medicamento (Ingelman-Sundberg, 2005).

Os dados desta pesquisa demonstraram que, para o M1 formando após aplicação intramuscular do tramadol, maior constante de absorção (k_{01}) e menor de eliminação (k_{10}). O metabólito foi aumentando de concentração ao longo do tempo, até atingir $C_{máx}$ aproximadamente 0,8 horas, para ambas vias de administração.

A AUC e $C_{máx}$ foram consideravelmente elevadas para quando os caprinos foram tratados com o opioide intravenoso, o que pode determinar influência na eficácia analgésica do medicamento.

CONCLUSÕES

Os dados demonstraram a segurança do uso do tramadol e descreveram os parâmetros farmacocinéticos do tramadol e M1 após administração intravenosa e intramuscular em caprinos.

A metodologia empregada pode ser usada em futuros estudos contendo o fármaco e matriz biológica.

Outros estudos são necessários para aliar os dados farmacocinéticos com avaliação clínica para definir a eficácia analgésica do opioide nesta dose e vias de administração.

Agradecimentos - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Projeto nº 474936/2013-9.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN S., LEEDER J., WILSON J., GAEDIGK A., GOTSCHALL, R., MEDVE R., LIAO S., SPIELBERG S., KEARNS G. Concordance between tramadol and dextromethorphan parent / metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 24–29, 2002.

AJADI, RA., OWANIKIN, AO., MARTINS, MM., GAZAL, OS. Effect of epidural tramadol and lignocaine on physiological and behavioural changes in goats subjected to castration with a high tension band. **New Zealand Veterinary Association**, v. 60, n.6, p. 344-348, 2012.

BORTOLAMI E., ROCCA D.G., DI SALVO A., GIORGI M., KIM T.W., ISOLA M., BENEDICTIS G.M. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 3, p. 404-9, 2015.

COX S., MARTIN-JIMENEZ T., VAN AMSTEL, S., DOHERTY, T. Pharmacokinetics of intravenous and intramuscular tramadol in Llamas. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 259-264, 2010.

DE LEO, M. et al. Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, n.2, p. 228-236, 2009.

DEHKORDI, S.H., BIGHAM-SADEGH, A., GERAMI R. Evaluation of anti-nociceptive effect of epidural tramadol, tramadol-lidocaine and lidocaine in goats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 39, n. 1, p.106-10, 2012

DHANJAL J.K., WILSON D.V., ROBINSON E., TOBIN T.T., Dirikolu L. Intravenous tramadol: effects, nociceptive properties, and pharmacokinetics in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 36, p. 581–590, 2009.

ELGHAZALI M., BAREZAIK I.M., ABDEL HADI A.A., ELTAYEB F.M., AL MASRI J & WASFI IA. The pharmacokinetics, metabolism and urinary detection time of tramadol in camels. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 272–277, 2008.

FERNANDES, F., ISMAIL, PC., 2006. Conceitos farmacocinéticos fundamentais. In: Cangiani, LM., Posso, IP., Potério, G MB., Nogueira, C.S. (Eds.), **Tratado de anestesiologia SAESP**. Vol 1. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, pp 207-218.

GIORGI M., CARLO S.D., SGORBINI M. & SACCOMANNI G. Pharmacokinetics of Tramadol and Its Metabolites M1, M2, and M5 in Donkeys after Intravenous and Oral Immediate Release Single-Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

GIORGI M., SOLDANI G., MANERA C., FERRARINI P.L., SGORBINI M., & SACCOMANNI G. Pharmacokinetics of Tramadol and its Metabolites M1, M2 and M5 in Horses Following Intravenous, Immediate Release (Fasted/Fed) and Sustained Release Single Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 481-488, 2007.

GROND S. & SABLITZKI A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clinical pharmacokinetics**, v.43, n.13, p. 879-923, 2004.

HABIBIAN, S.; BIGHAM, A. S.; AALI, E. Comparison of lidocaine, tramadol and lidocaine–tramadol for epidural analgesia in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 434–438, 2011.

HENNIES, H. H.; FRIDERICHS, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, p. 877–880, 1988.

INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 5, p. 6–13, 2005.

KUKANICH, B.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyiltramadol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 239-46, 2004.

LINTZ, W.; URAGG, H. Quantitative determination of tramadol in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography**, v. 341, n. 1, p. 65-79, 1998.

LOFTSSON, T. 2015. Essential Pharmacokinetics - A Primer for Pharmaceutical Scientists Basic. Capitulo: **Concepts of Pharmacokinetics**. Elsevier Inc. 1 ed. 178p

PAOLOZZI, R. J. et al. Diferentes doses de tramadol em cães: ações analgésicas, sedativas e sobre o sistema cardiorrespiratório. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1417-1423, 2011.

PEDERSEN R. S., DAMKIER P., BROSEN K. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p. 513–521, 2006.

PYPENDOP, B. H.; SIAO, K. T.; ILKIW, J.E. Effects of tramadol hydrochloride on the thermal threshold in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 12, p. 1465-1470, 2009.

SHILO Y., BRITZI M., EYTAN B., LIFSCHITZ T., SOBACK S. & STEINMAN A. Pharmacokinetics of tramadol in horses after intravenous, intramuscular and oral administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 60-65, 2008.

SOUSA, A. B. et al. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyiltramadol in goats after intravenous and oral administration. **Journal veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 45-51, 2008.

SUBRAHMANYAM V., RENWICK A.B., WALTERS D.G., YOUNG P.J., PRICE R.J., TONELLI A.P. & LAKE B.G. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 29, n. 8, p. 1146–1155, 2001.

VETTORATO E., ZONCA A., ISOLA M., VILLA R., GALLO M., RAVASIO G., BECCAGLIA M., MONTESISSA C., CAGNARDI P. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p. 310-315, 2010.

WU W.N., MCKOWN L.A. & LIAO S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. **Xenobiotica**, v. 31, p. 423–441, 2002.

WYNNE P., GRIEVES N., EGAN S., ZAHRA P, VINE J. & LAWRENCE M. The application of Ultrafast LCMS to optimizing detection in the analysis of tramadol and its metabolites. TIAFT 2012 - the 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists took place 3–8 June 2012 in Hamamtsu, Japan.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tramadol é seguro e eficaz para o controle da dor na orquiectomia da espécie caprina, devendo ser administrado a cada 6 e 8 horas, nas doses de 2 e 4 mg.kg⁻¹ por via intravenosa.

A via intramuscular é alternativa viável para administração do fármaco, sendo que a biodisponibilidade é de 62%.

Após metabolização do tramadol, os caprinos não formam M4 e, dentre os metabólitos estudados, o M1 é o de maior importância.

Ao aliar farmacocinética e farmacodinâmica, este estudo revela importantes informações que subsidiarão o uso na prática clínica e prescrição do tramadol para a espécie caprina.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN S., LEEDER J., WILSON J., GAEDIGK A., GOTSCHALL, R., MEDVE R., LIAO S., SPIELBERG S., KEARNS G. Concordance between tramadol and dextromethorphan parent / metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 24–29, 2002.

ADAMI, C., BERGADANO, A., BRUCKMAIER, RM., STOFFEL, MH., DOHERR, MG., SPADAVECCHIA, C. Sciatic-femoral nerve block with bupivacaine in goats undergoing elective stifle arthrotomy. **Veterinary Journal**, v. 188, p. 53–57, 2011.

AJADI, R. A. et al. Effect of epidural tramadol and lignocaine on physiological and behavioural changes in goats subjected to castration with a high tension band. **New Zealand Veterinary Association**, v. 60, n.6, p. 344-348, 2012.

ALTAR C.A., HORNBERGER J., SHEWADE A., CRUZ V., GARRISON J., MRAZEK D. Clinical validity of cytochrome P450 metabolism and serotonin gene variants in psychiatric pharmacotherapy. **International Review of Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 509-33, 2013.

ANVISA 1998. **Portaria N 3916/MS/GM**, de 30 de outubro de 1998. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/glossario/glossario_b.htm> Acesso em 30 de março de 2017.

ANVISA 2003. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o

o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES

> Acesso em 13 de novembro de 2013.

ARDAKANI Y.H, ROUINI M.R. Pharmacokinetics of tramadol and its three main metabolites in healthy male and female volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 28, n. 9, p. 527-534, 2007.

BALLANTYNE, J. Tramadol: Its role in acute pain management. **Acute Pain, Amsterdam**, v. 1, n. 2, p. 5-6, 1998.

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

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

BORTOLAMI E., ROCCA D.G., DI SALVO A., GIORGI M., KIM T.W., ISOLA M., BENEDICTIS G.M. Pharmacokinetics and antinociceptive effects of tramadol and its metabolite O-desmethyltramadol following intravenous administration in sheep. **The Veterinary Journal**, v. 205, n. 3, p. 404-9, 2015.

BOSILKOVSKA M., WALDER B., BESSON M., DAALI Y., DESMEULES J. Analgesics in patients with hepatic impairment: pharmacology and clinical implications. **Drugs**. 72(12):1645–1669, 2012.

BRASIL. Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2017.

CAGNARDI, P., VILLA, R., ZONCA, A., GALLO, M., BECCAGLIA, M., LUVONI, GC., VETTORATO, E., CARLI S., FONDA, D., RAVASIO, G. Pharmacokinetics, intraoperative effect and postoperative analgesia of tramadol in cats. **Research in Veterinary Science**, v.90, n. 3, p. 503–509, 2011.

COX S., MARTIN-JIMENEZ T., VAN AMSTEL, S., DOHERTY, T. Pharmacokinetics of intravenous and intramuscular tramadol in Llamas. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, p. 259-264, 2010.

CURTICAPEAN, A., MUNTEAN, D., CURTICAPEAN, M., DOGARU, M., VARI C., Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in human plasma. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1304-1312.

DE LEO, M. et al. Evaluation of tramadol and its main metabolites in horse plasma by high-performance liquid chromatography/fluorescence and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry techniques. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 23, n.2, p. 228-236, 2009.

DEHKORDI, S.H.; BIGHAM-SADEGH, A.; GERAMI, R. Evaluation of anti-nociceptive effect of epidural tramadol, tramadol-lidocaine and lidocaine in goats. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 39, n. 1, p.106-10, 2012.

DEPRIEST A.Z., PUET B.L., HOLT A.C., ROBERTS A., CONE E.J. Metabolism and disposition of prescription opioids: a review. **Forensic Science Review**, v. 27, n. 2, p. 115–145, 2015.

DHANJAL J.K., WILSON D.V., ROBINSON E., TOBIN T.T., Dirikolu L. Intravenous tramadol: effects, nociceptive properties, and pharmacokinetics in horses. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 36, p. 581–590, 2009.

EDMONDSON M.A., DURAN S.H., BOOTHE D.M., STEWART A.J. RAVIS, W.R. Pharmacokinetics of tramadol and its major metabolites in alpacas following intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 389–396, 2011.

ELGHAZALI M., BAREZAIK I.M., ABDEL HADI A.A., ELTAYEB F.M., AL MASRI J & WASFI IA. The pharmacokinetics, metabolism and urinary detection time of tramadol in camels. **The Veterinary Journal**, v. 178, n. 2, p. 272–277, 2008.

ELHAKIM M., ABD EL-MEGID W., METRY A., EL-HENNAWY A. & EL-QUESENY K. 2005. Analgesic and antacid properties of i.m. tramadol given before Caesarian section under general anesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, p. 811–815, 2005

FDA-FOOD and drug administration. **Compliance program guidance manual – in vivo bioequivalence.** Disponível em:

<https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/ComplianceProgramManual/ucm255614.htm>> Acesso em Acesso em 30 de março de 2017.

FERNANDES, F., ISMAIL, PC., 2006. Conceitos farmacocinéticos fundamentais. In: CANGIANI, LM., POSSO, IP., POTÉRIO, G MB., NOGUEIRA, C.S. (Eds.), **Tratado de anestesiologia SAESP**. Vol 1. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, pp 207-218.

GIORGI M., CARLO S.D., SGORBINI M. & SACCOMANNI G. Pharmacokinetics of Tramadol and Its Metabolites M1, M2, and M5 in Donkeys after Intravenous and Oral Immediate Release Single-Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

GIORGI M., SOLDANI G., MANERA C., FERRARINI P.L., SGORBINI M., & SACCOMANNI G. Pharmacokinetics of Tramadol and its Metabolites M1, M2 and M5 in Horses Following Intravenous, Immediate Release (Fasted/Fed) and Sustained Release Single Dose Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, p. 481-488, 2007.

GIORGI, M. Veterinary pharmacology: Is it still pharmacology's Cinderella? *Clin Exp Pharmacol*. 2:2, 2012.

GROND S. & SABLITZKI A. Clinical pharmacology of tramadol. **Clinical pharmacokinetics**, v.43, n.13, p. 879-923, 2004.

HABIBIAN, S.; BIGHAM, A. S.; AALI, E. Comparison of lidocaine, tramadol and lidocaine–tramadol for epidural analgesia in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 434–438, 2011.

HENNIES, H. H.; FRIDERICH, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittel-Forschung**, v. 38, p. 877–880, 1988.

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES

INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 5, p. 6–13, 2005.

JARDIM I.C.S.F., COLLINS, C.H. & GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins C. H., Braga G. L., Bonito P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas SP: Editora da UNICAMP, 453 p.

KHOSROJERDI H., ALIPOUR TALESH G., DANAEI G.H., SHOKOOH SAREMI S., ADAB A. & AFSHARI R. Tramadol half life is dose dependent in overdose. **Daru**, v. 23, n. 1, p. 22, 2015.

KNYCH, H. K. et al. Pharmacokinetics and selected pharmacodynamic effects of tramadol following intravenous administration to the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 4, p. 490–496, 2013.

KUKANICH, B.; PAPICH, M. G. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O-desmethyiltramadol in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 239-46, 2004.

LEWIS, K. S.; HAN, N. H. Tramadol: A new centrally acting analgesic. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 54, n. 6, p. 643-652, 1997.

LINTZ, W.; URAGG, H. Quantitative determination of tramadol in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal Chromatography**, v. 341, n. 1, p. 65-79, 1998.

LOFTSSON, T. 2015. Essential Pharmacokinetics - A Primer for Pharmaceutical Scientists Basic. Capítulo: **Concepts of Pharmacokinetics**. Elsevier Inc. 1 ed. 178p

MALONNE, H. et al. Efficacy and tolerability of sustained-release tramadol in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the hip or knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 11, p. 1774-1782, 2004.

MASTROCINQUE, S.; FANTONI, D.T. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in bitches submitted to ovariohysterectomy. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.30, p.220-228, 2003.

McMILLIAN, C. J. et al. pharmacokinetics of intravenous tramadol in dog. Canadian journal of veterinary research, **Ottawa**, v. 72, n 4, p. 325-331, 2008.

MIKSYS S., RAO Y., SELLERS E.M., KWAN M., MENDIS D. & TYNDALE RF. Regional and cellular distribution of CYP2D subfamily members in rat brain. **Xenobiotica**, v. 30, n. 6, p. 547-564, 2000.

MIOTTO K., CHO A.K., KHALIL M.A., BLANCO K. & SASAKI J.D.. Rawson R.. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. **Anesthetic Clinical Pharmacology**, v. 124, n. 1, p. 44–51, 2017.

PAOLOZZI, R. J. et al. Diferentes doses de tramadol em cães: ações analgésicas, sedativas e sobre o sistema cardiorrespiratório. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1417-1423, 2011.

PEDERSEN R. S., DAMKIER P., BROSEN K. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 62, p. 513–521, 2006.

PYPENDOP, B. H.; SIAO, K. T.; ILKIW, J.E. Effects of tramadol hydrochloride on the thermal threshold in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 12, p. 1465-1470, 2009.

RAFFA, R. B.; STONE, D. J. Unexceptional seizure potential of tramadol or its enantiomers or metabolites in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 557–562, 2008.

SCOTT, P. R. The management and welfare of some common ovine obstetrical problems in the United Kingdom. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 33–40, 2005.

SHARDA, R. T.; TRANQUILLI, W. J. **Anestésicos locais**. In: TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. Lumb & Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária. 4 ed. São Paulo: Roca, 2013. p. 428-454.

SHILO Y., BRITZI M., EYTAN B., LIFSCHITZ T., SOBACK S. & STEINMAN A. Pharmacokinetics of tramadol in horses after intravenous, intramuscular and oral administration. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 60-65, 2008.

SOUSA, A. B. et al. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyiltramadol in goats after intravenous and oral administration. **Journal veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 45-51, 2008.

STAMER, U. M. et al. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. **Pain**, v. 105, n. 1-2, p. 231-238, 2003.

STORPIRTIS S., & CONSIGLIERI V.O. Biodisponibilidade e Bioequivalência de medicamentos: Aspectos fundamentais para o planejamento e execução de estudos. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 63-70, 1995.

SUBRAHMANYAM V., RENWICK A.B., WALTERS D.G., YOUNG P.J., PRICE R.J., TONELLI A.P. & LAKE B.G. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metabolism & Disposition*, v. 29, n. 8, p. 1146–1155, 2001.

VARCOE-COCKS, K. et al. Pressure algometry to quantify muscle pain in racehorses with suspected sacroiliac dysfunction. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n.6, p. 558-562, 2006.

VÉKEY K.J. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227–236, 2001.

VETTORATO E., ZONCA A., ISOLA M., VILLA R., GALLO M., RAVASIO G., BECCAGLIA M., MONTESISSA C., CAGNARDI P. Pharmacokinetics and efficacy of intravenous and extradural tramadol in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p. 310-315, 2010.

WU W.N., MCKOWN L.A. & LIAO S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. **Xenobiotica**, v. 31, p. 423–441, 2002.

WYNNE P., GRIEVES N., EGAN S., ZAHRA P, VINE J. & LAWRENCE M. The application of Ultrafast LCMS to optimizing detection in the analysis of tramadol and its

metabolites. TIAFT 2012 - the 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists took place 3–8 June 2012 in Hamamatsu, Japan.